

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**ALESSANDRA CRISTINA PEDRO**

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, FITOQUÍMICA E BIOATIVIDADE DE  
FRUTAS *Lycium barbarum* L. CULTIVADAS NO SISTEMA ORGÂNICO E  
CONVENCIONAL.**

**CURITIBA**

**2018**

**ALESSANDRA CRISTINA PEDRO**

**CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, FITOQUÍMICA E BIOATIVIDADE DE  
FRUTAS *Lycium barbarum* L. CULTIVADAS NO SISTEMA ORGÂNICO E  
CONVENCIONAL.**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> María de Cortes Sánchez-Mata.

**CURITIBA**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR  
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

- 
- P372c      Pedro, Alessandra Cristina  
              Caracterização nutricional, fitoquímica e bioatividade de frutas *Lycium barbarum* L. cultivadas no sistema orgânico e convencional / Alessandra Cristina Pedro. – Curitiba, 2018.  
              139 f. : il. color. ; 30 cm.
- Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, 2018.
- Orientador: Charles Windson Isidoro Haminiuk.  
              Coorientadora: Maria de Cortes Sánchez-Mata.
1. Sistemas de cultivo. 2. Metais pesados. 3. Frutas orgânicas. 4. Carotenoides. 5. Atividade antimicrobiana. I. Universidade Federal do Paraná. II. Haminiuk, Charles Windson Isidoro. III. Sánchez-Mata, Maria de Cortes. IV. Título.

CDD: 664.8

---



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR TECNOLOGIA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **ALESSANDRA CRISTINA PEDRO** intitulada: **CARACTERIZAÇÃO NUTRICIONAL, FITOQUÍMICA E BIOATIVIDADE DE FRUTAS *Lycium barbarum* L. CULTIVADAS NO SISTEMA ORGÂNICO E CONVENCIONAL.**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Fevereiro de 2018.



CHARLES WINDSON ISIDORO HAMINIUK  
Presidente da Banca Examinadora



MARIA LUCIA MASSON  
Avaliador Interno



LUCIANA PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE  
Avaliador Externo



ROSEMARY HOFFMANN RIBANI  
Avaliador Interno



LUCIANO HENRIQUE CAMPESTRINI  
Avaliador Externo

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e determinação durante esta longa caminhada.

Aos meus amados pais Mário e Marilda, irmã Beatriz e namorado Robson, pelo forte incentivo, apoio e compreensão.

Ao professor Dr. Charles Windson Isidoro Haminiuk, meu orientador, pela ajuda e oportunidade de realizar este trabalho.

Às professoras, Dra. Juliana Bello Baron Maurer e Dra. Selma Faria Zawadski-Baggio, por cederem seus laboratórios para a realização de análises que fizeram parte deste trabalho e do artigo publicado na *Industrial Crops and Products*.

A las profesoras Dra. María de Cortes Sánchez-Mata y Dra. María Luiza Pérez Rodríguez agradezco muchísimo el apoyo y la orientación durante durante el período en la Universidad Complutense de Madrid (Madrid/Espanha). A todas las profesoras, tecnicos y colegas del Departamento de Nutrición y Bromatología II de la Facultad de Farmacia.

Aos meus amigos, que estiveram sempre incentivando o meu trabalho.

A Capes pelo auxílio financeiro durante todo o período de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos e doutorado sanduíche na Universidad Complutense de Madrid.

## RESUMO GERAL

Frutas *Lycium barbarum* L., conhecidas como goji berry, são frequentemente encontradas na China, Tibet e em algumas regiões da Ásia. Estas frutas têm grande importância na medicina tradicional chinesa, pois apresentam diferentes atividades biológicas, como antitumoral e antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi avaliar a composição nutricional, fitoquímica e biológica de extratos e óleos obtidos de frutas *Lycium barbarum* L. cultivadas nos sistemas orgânico e convencional. Quanto à composição nutricional frutas goji orgânicas e convencionais podem ser consideradas interessantes fontes de açúcares totais disponíveis (67,85 e 75,05%), fibras alimentares (9,88 e 11,27%) e minerais essenciais (Mg, Fe, Zn, Cu e Mn). Frutas convencionais apresentaram conteúdos dos metais pesados Hg e Pb acima do limite estabelecido pela Codex Alimentarius. Entre os açúcares solúveis e ácidos orgânicos, a frutose (5,45 e 4,92 g/100 g) e o ácido cítrico (0,90 e 1,14 g/100 g) foram identificados em maiores concentrações nas frutas goji. Extratos ricos em compostos fenólicos (1338,80 mg/100 g) obtidos de frutas goji orgânicas através de condições otimizadas (45 °C, 162 min e relação sólido:solvente (g:mL) 1:10) mostraram um fator de proteção (FP) à oxidação do óleo de soja significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ) aos antioxidantes sintéticos BHA e BHT. O ácido síngico foi identificado como principal ácido fenólico em amostras orgânicas de goji berry. O método de extração de ultrassom, quando comparado com *shaker*, mostrou maior conteúdo ( $p \leq 0,05$ ) de fenólicos totais e atividade antioxidante em extratos e amostras sólidas (*Quencher*) de goji berry. O método Folin-Ciocalteu, quando comparado ao *Fast-Blue* BB, apresentou maior ( $p \leq 0,05$ ) conteúdo de fenólicos totais. O conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram entre 3 a 20 vezes maiores em amostras sólidas (*Quencher*), comparados aos extratos. Os principais carotenoides identificados nas amostras de goji berry foram a (all-*E*)-luteína e (all-*E*)-zeaxantina. Frutas orgânicas e convencionais mostraram conteúdos (em mg/100 g) de ácido ascórbico total (101,83 e 80,46), L-ascórbico (34,88 e 40,87) e L-dehidroascórbico (66,95 e 39,60) superiores a outras frutas fontes de vitamina C (laranja, morango e *kiwi*). Extratos fenólicos da goji orgânica e convencional mostraram concentrações mínimas inibitórias (CMI's) de 10 a 40 e 40 a 80 mg/mL, respectivamente, contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*. Os óleos da goji berry obtidos por Soxhlet mostraram os maiores rendimentos (4,58-2,83%). O método de Bligh & Dyer foi o mais eficiente para a extração de ácidos graxos insaturados (*AGI*) de frutas orgânicas (87,20%) e convencionais (82,53%). O ácido linoleico foi o principal ácido graxo e a zeaxantina o principal carotenoide presente nos óleos das amostras de goji berry orgânica e convencional. O método de Maceração mostrou maior atividade antioxidante (2,23 a 40,94 mmolTE/100 g) e antimicrobiana (3,12 a 200 mg/mL) nas frutas analisadas. Portanto, a goji berry cultivada no sistema orgânico pode ser considerada um componente seguro que pode ser utilizada na indústria como um potencial ingrediente alimentício.

**Palavras-chave:** sistemas de cultivo, metais pesados, frutas orgânicas, carotenoides, atividade antimicrobiana.

## GENERAL ABSTRACT

*Lycium barbarum* L. fruits, known as goji berry, are often found in China, Tibet and some regions of Asia. These fruits have great importance in traditional Chinese medicine, as they present different biological activities, such as antitumor and antimicrobial. The objective of this study was to evaluate the nutritional, phytochemical and biological composition of extracts and oils obtained from fruits *Lycium barbarum* L. grown in the organic and conventional systems. Regarding nutritional composition, organic and conventional fruits can be considered as interesting sources of total available sugars (67.85 and 75.05%), dietary fibers (9.88 and 11.27%) and essential minerals (Mg, Fe, Zn, Cu and Mn). Conventional fruits presented Hg and Pb (heavy metals) content above the limit established by the Codex Alimentarius. Among soluble sugars and organic acids, fructose (5.45 and 4.92 g/100 g) and citric acid (0.90 and 1.14 g/100 g) were identified in higher concentrations in goji fruits. Extracts rich in phenolic compounds (1338.80 mg/100 g) obtained from organic goji fruits under optimized conditions (45 °C, 162 min and solid:solvent ratio (g:mL) 1:10) showed a protection factor (PF) to the oxidation of soybean oil significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than the synthetic antioxidants BHA and BHT. Syringic acid was identified as the main phenolic acid in organic goji berries. The ultrasonic extraction method, when compared to shaker, showed higher total phenolics ( $p \leq 0.05$ ) and antioxidant activity in extracts and solid samples (Quencher) of goji berry. The Folin-Ciocalteu method, when compared to Fast-Blue BB, presented higher ( $p \leq 0.05$ ) total phenolic content. The content of phenolic compounds and antioxidant activity were 3 to 20 times higher in solid samples (Quencher), compared to extracts. The major carotenoids identified in the goji berry samples were (all-*E*)-lutein and (all-*E*)-zeaxanthin. Organic and conventional fruits showed contents (in mg/100 g) of total ascorbic acid (101.83 and 80.46), L-ascorbic (34.88 and 40.87) and L-dehydroascorbic (66.95 and 39.60) superior to other fruit sources of vitamin C (orange, strawberry and kiwi). Organic and conventional goji phenolic extracts showed minimal inhibitory concentrations (MICs) of 10 to 40 and 40 to 80 mg/mL, respectively, against *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. The goji berry oils obtained by Soxhlet showed the highest yields (4.58-2.83%). The Bligh & Dyer method was the most efficient for the extraction of unsaturated fatty acids (UFA) from organic fruits (87.20%) and conventional (82.53%). Linoleic acid was the major fatty acid and zeaxanthin was the main carotenoid present in oils from organic and conventional goji berry samples. The Maceration method showed higher antioxidant activity (2.23 to 40.94 mmolTE/100 g) and antimicrobial activity (3.12 to 200 mg/mL) in the fruits analyzed. Therefore, goji berry grown in the organic system can be considered a safe component that can be used in the food industry as a food ingredient potential.

**Key words:** culture systems, heavy metals, organic fruits, carotenoids, antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura 01</b> Flores e frutos da <i>Lycium barbarum</i> L.....	20
<b>Figura 02</b> Secagem de goji berry ao sol (A), Frutas secas de <i>L. barbarum</i> L. e <i>L. chinense</i> Miller de diferentes regiões da China (B).....	21
<b>Figura 03</b> Elementos básicos do metabolismo primário e secundário de plantas.....	23
<b>Figura 04</b> Principais ácidos orgânicos presentes em frutas <i>Lycium barbarum</i> L.....	26
<b>Figura 05</b> Principais ácidos graxos insaturados presentes em fontes vegetais.....	27
<b>Figura 06</b> Estrutura química dos dois grupos de ácidos fenólicos encontrados em frutas e vegetais: (A) ácido hidroxibenzóico e (B) ácido hidroxicinâmico.....	29
<b>Figura 07</b> Estrutura química comum dos flavonoides.....	30
<b>Figura 08</b> Estrutura das principais classes de flavonoides.....	30
<b>Figura 09</b> Oxidação reversível do ácido L-ascórbico em ácido L-dehidroascórbico.....	32
<b>Figura 10</b> Estruturas dos principais carotenoides encontrados em frutas e vegetais.....	34
<b>Figura 11</b> Mecanismo de ação de compostos antioxidantes.....	35

### CAPÍTULO II

<b>Figura 12</b> Perfil cromatográfico dos açúcares solúveis de frutas goji orgânicas e convencionais: Frutose (1), Glicose (2) e Sacarose (3).....	51
<b>Figura 13</b> Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de frutas goji orgânicas e convencionais: Oxálico (1), Tartárico (2), Quínico (3), Málico (4), Cítrico (5) e Fumárico (6).....	54
<b>Figura 14</b> Microfotografias da goji berry orgânica (A) e (C), e convencional (B) e (D), inteiras e trituradas.....	56
<b>Figura 15</b> Amostras da goji berry orgânica (A) e (C), e convencional (B) e (D), inteiras e trituradas.....	57

### CAPÍTULO III

<b>Figura 16</b> Valores médios observados e função desejável obtidos para os extratos fenólicos da goji berry orgânica através da otimização simultânea.....	76
<b>Figura 17</b> Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de frutas goji orgânicas: (A) 260 nm – ácido gálico (1), ácido 4-hidroxibenzoico (2), kaempferol (3); (B) 270 nm – ácido sirínico (1), rutina (2); (C) 280 nm – catequina (1), naringina (2), ácido trans-cinâmico (3); (D) 300 nm – ácido cafeico (1),	



ácido clorogênico (2), ácido <i>p</i> -cumárico (3), ácido ferulico (4), quercetina (5).....	77
<b>Figura 18</b> Fator de proteção (FP) de diferentes concentrações do extrato orgânico otimizado e antioxidantes sintéticos (BHT, BHA e TBHQ) adicionados ao óleo de soja.....	80

#### CAPÍTULO IV

<b>Figura 19</b> Reação entre o sal de diazônio ( <i>Fast Blue</i> BB) e o ácido clorogênico.....	92
<b>Figura 20</b> Perfil cromatográfico dos extratos de carotenoides insaponificados de frutas goji orgânicas e convencionais: (1) (all- <i>E</i> )-luteína, (2) (all- <i>E</i> )-zeaxantina e (3) não identificado.....	94
<b>Figura 21</b> Perfil cromatográfico dos extratos de carotenoides saponificados de frutas goji orgânicas e convencionais.....	95
<b>Figura 22</b> Cromatogramas de amostras de goji berry orgânica e convencional comparados com o padrão ácido ascórbico.....	98
<b>Figura 23</b> Cromatogramas do ácido L-dehidroascórbico obtido de amostras de goji berry orgânica e convencional.....	99

#### CAPÍTULO V

<b>Figura 24</b> Perfil espectral representativo (RMN) de uma amostra de óleo de goji berry com a respectiva atribuição dos sinais da unidade de glicerol e as cadeias de ácidos graxos.....	111
<b>Figura 25</b> Espectro de RMN do óleo extraído da goji berry convencional por Soxhlet (S), Maceração (M) e Bligh & Dyer (BD).....	112
<b>Figura 26</b> Espectro de RMN do óleo extraído da goji berry orgânica por Soxhlet (S), Maceração (M) e Bligh & Dyer (BD).....	112
<b>Figura 27</b> Espectro de Raman de óleos extraídos da goji berry orgânica e convencional por Maceração (MO e MC), Bligh & Dyer (BO e BC) e Soxhlet (SO e SC).....	114

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 01</b>	Composição nutricional, energia e contribuição para a cota dietética recomendada (RDA) da goji berry orgânica e convencional.....	<b>47</b>
<b>Tabela 02</b>	Composição mineral, metais pesados e contribuição para a cota dietética recomendada (RDA) de amostras de goji berry.....	<b>49</b>
<b>Tabela 03</b>	Conteúdo de açúcares solúveis em frutas goji orgânica e convencional.....	<b>52</b>
<b>Tabela 04</b>	Acidez titulável total, pH, sólidos solúveis totais, atividade de água e cor da goji berry orgânica e convencional.....	<b>53</b>
<b>Tabela 05</b>	Conteúdo de ácidos orgânicos em frutas goji orgânica e convencional.....	<b>55</b>

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 06</b>	Planejamento Box-Behnken para a extração de compostos bioativos da goji berry orgânica.....	<b>63</b>
<b>Tabela 07</b>	Conteúdo de compostos bioativos extraídos da goji berry orgânica com diferentes solventes.....	<b>68</b>
<b>Tabela 08</b>	Planejamento Box-Behnken com dados experimentais dos compostos bioativos extraídos da goji berry orgânica.....	<b>72</b>
<b>Tabela 09</b>	Parâmetros cromatográficos e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides da goji berry orgânica.....	<b>79</b>

### CAPÍTULO IV

<b>Tabela 10</b>	Fenólicos totais e atividade antioxidante de extratos obtidos por diferentes métodos e amostras sólidas da goji berry orgânica e convencional.....	<b>90</b>
<b>Tabela 11</b>	Conteúdo de carotenoides insaponificados e saponificados em frutas goji orgânica e convencional.....	<b>96</b>
<b>Tabela 12</b>	Conteúdo de ácido ascórbico em frutas goji orgânica e convencional.....	<b>100</b>
<b>Tabela 13</b>	Concentrações mínimas inibitórias (CMI's) obtidas para extratos fenólicos de goji berry orgânica e convencional.....	<b>100</b>

### CAPÍTULO V

<b>Tabela 14</b>	Rendimentos dos óleos extraídos da goji berry orgânica e convencional por diferentes métodos.....	<b>109</b>
------------------	---	------------

<b>Tabela 15</b>	Composição de ácidos graxos de óleos de frutas goji (orgânica e convencional) como % (p/p) obtidos com diferentes métodos.....	<b>113</b>
<b>Tabela 16</b>	Atividade antioxidante de óleos da goji berry orgânica e convencional por FRAP, ABTS e DPPH <sup>1</sup> .....	<b>117</b>
<b>Tabela 17</b>	Concentrações mínimas inibitórias (CMI's) obtidas para óleos da goji orgânica e convencional.....	<b>119</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABTS<sup>+</sup></b>	Radical 2,2'-azino-bis(ácido 3-etilbenztiazolina-6-sulfônico)
<b>AGI</b>	Ácido graxo insaturado
<b>AGS</b>	Ácido graxo saturado
<b>AH</b>	Antioxidante
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>AOAC</b>	Associação de Químicos Agrícolas Oficiais (Association of Official Agricultural Chemists)
<b>AT</b>	Antocianinas totais
<b>ATCC</b>	Coleção Americana de Culturas (American Type Culture Collection)
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>ATT</b>	Acidez titulável total
<b>Aw</b>	Atividade de água
<b>BHA</b>	Butil-hidroxianisol (2 e 3-terc-butil-4-hidroxianisol)
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno (2,6-di-terc-butil-4-metilfenol)
<b>CLAE-IR</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de índice de refração
<b>CLUE</b>	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
<b>CMI</b>	Concentração mínima inibitória
<b>CFT</b>	Compostos fenólicos totais
<b>CT</b>	Carotenoides totais
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPPH<sup>•</sup></b>	Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil
<b><i>FAST BLUE BB</i></b>	Sal de hemi(cloreto de zinco)
<b>FID</b>	Detetor de ionização de chama
<b>Fisher LSD</b>	Diferença significativa de Fisher (Fishers Least Significant Difference)
<b>FNB</b>	Conselho de Alimentação e Nutrição (Food and Nutrition Board)
<b>FP</b>	Fator de proteção à deterioração

<b>FT</b>	Flavonoides totais
<b>FRAP</b>	Poder antioxidante de redução férrica (Ferric Reduction Antioxidant Power)
<b>MEV</b>	Microscopia eletrônica de varredura
<b>MMT</b>	Método colorimétrico tetrazólio
<b>MSR</b>	Metodologia de superfície de resposta
<b>MUFAs</b>	Ácidos graxos monoinsaturados
<b>PTFE</b>	Politetrafluoretileno denso
<b>PUFAs</b>	Ácidos graxos poliinsaturados
<b>PVDF</b>	Fluoreto de polivinilideno
<b>RDA</b>	Ingestão diária recomendada (Recommended dietary allowance)
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SST</b>	Sólidos solúveis totais
<b>TBHQ</b>	Terc-butil-hidroquinona (2-(1,1-Dimetiletil)-1,4-benzenediol)
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tris(2-piridil)-S-triazina
<b>USDA</b>	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (United States Department of Agriculture)
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia na região do ultravioleta visível

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>16</b>
<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>17</b>

<b>CAPÍTULO I - Revisão da Literatura</b> .....	<b>18</b>
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1 GOJI BERRY ( <i>Lycium barbarum</i> L.).....	18
1.1.1 Classificação científica.....	18
1.1.2 Origem e distribuição geográfica.....	18
1.1.3 Aspectos morfológicos.....	19
1.1.4 Formas de uso e características mercadológicas.....	19
1.1.5 Metabolismo vegetal.....	21
1.2 METABÓLITOS PRIMÁRIOS DA GOJI BERRY.....	23
1.2.1 Carboidratos.....	23
1.2.2 Ácidos orgânicos.....	24
1.2.3 Ácidos graxos.....	25
1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA GOJI BERRY.....	27
1.3.1 Compostos fenólicos.....	27
1.3.2 Terpenos (carotenoides).....	30
1.4 VITAMINAS DA GOJI BERRY.....	32
1.5 FUNCIONALIDADES DE COMPOSTOS BIOATIVOS.....	33
1.5.1 Atividade antioxidante.....	33
1.5.2 Atividade antimicrobiana.....	36

<b>CAPÍTULO II - Propriedades nutricionais e sensoriais da goji berry (<i>Lycium barbarum</i> L.) cultivada no sistema orgânico e convencional</b> .....	<b>38</b>
RESUMO.....	39
1 INTRODUÇÃO.....	38
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
2.1 MATERIAIS.....	40
2.1.1 Reagentes.....	40
2.1.2 Amostra.....	40
2.2 MÉTODOS.....	40
2.2.1 Umidade.....	40
2.2.2 Cinzas e metais pesados.....	41
2.2.3 Composição mineral.....	41
2.2.4 Proteínas.....	41
2.2.5 Lipídeos.....	42

2.2.6 Carboidratos disponíveis (açúcares totais).....	42
2.2.7 Açúcares solúveis.....	42
2.2.8 Fibras alimentares (insolúveis e solúveis).....	43
2.2.9 Acidez titulável, pH, sólidos solúveis, atividade de água e cor.....	44
2.2.10 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	44
2.2.11 Ácidos orgânicos.....	44
2.2.12 Contribuição para a cota dietética recomendada (RDA - <i>Recommended dietary allowance</i> ).....	45
2.2.13 Análise estatística.....	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	45
CONCLUSÃO.....	57

### **CAPÍTULO III - Otimização da extração de compostos bioativos da goji berry orgânica (*Lycium barbarum* L.) e avaliação da estabilidade oxidativa no óleo de soja.....**

RESUMO.....	58
1 INTRODUÇÃO.....	58
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	60
2.1 MATERIAIS.....	60
2.1.1 Reagentes.....	60
2.1.2 Amostra.....	60
2.2 MÉTODOS.....	60
2.2.1 Seleção de solventes.....	60
2.2.2 Planejamento experimental.....	61
2.2.3 Compostos fenólicos totais (CFT).....	62
2.2.4 Flavonoides totais (FT).....	62
2.2.5 Antocianinas totais (AT).....	63
2.2.6 Carotenoides totais (CT).....	63
2.2.7 Atividade antioxidante.....	63
2.2.8 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE).....	64
2.2.9 Teste de Rancimat.....	65
2.2.10 Análise estatística.....	65
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
3.1 Experimentos preliminares (seleção de solventes).....	66
3.2 Metodologia de superfície de resposta (MSR).....	70
3.3 Análise de CLUE do extrato otimizado.....	76
3.4 Teste de Rancimat.....	79
CONCLUSÃO.....	81

<b>CAPÍTULO IV - Fitoquímicos e atividade biológica de futas <i>Lycium barbarum</i> L. orgânicas e convencionais</b>	<b>82</b>
RESUMO	82
1 INTRODUÇÃO	82
2 MATERIAIS E MÉTODOS	84
2.1 MATERIAIS	84
2.1.1 Reagentes	84
2.1.2 Amostra	84
2.2 MÉTODOS	84
2.2.1 Compostos fenólicos	84
2.2.1.1 Extratos fenólicos	85
2.2.1.2 Quantificação de compostos fenólicos totais	85
2.2.2 Carotenoides totais	86
2.2.2.1 Perfil cromatográfico de carotenoides	86
2.2.3 Ácido ascórbico e dehidroascórbico: Vitamina C	87
2.2.4 Atividade antioxidante	87
2.2.5 Atividade antimicrobiana	87
2.2.5.1 Cepas microbianas	88
2.2.5.2 Preparação da suspensão bacteriana	88
2.2.5.3 Microdiluição	88
2.2.6 Análise estatística	88
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
3.1 Compostos fenólicos	89
3.2 Carotenoides	92
3.3 Ácido ascórbico e dehidroascórbico: Vitamina C	96
3.4 Atividade antimicrobiana do extrato fenólico	99
CONCLUSÃO	101

<b>CAPÍTULO V - Caracterização e atividade biológica dos óleos de frutas <i>Lycium barbarum</i> L. cultivadas no sistema orgânico e convencional</b>	<b>102</b>
RESUMO	102
1 INTRODUÇÃO	102
2 MATERIAIS E MÉTODOS	104
2.1 MATERIAIS	104
2.1.1 Reagentes	104
2.1.2 Amostra	104
2.2 MÉTODOS	104
2.2.1 Procedimentos de extração	104
2.2.1.1 Soxhlet	104
2.2.1.2 Maceração	104
2.2.1.3 Bligh & Dyer	105
2.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)	105
2.2.3 Espectroscopia de Raman	106



2.2.4 Atividade antioxidante.....	106
2.2.5 Atividade antimicrobiana.....	106
2.2.5.1 Cepas microbianas.....	106
2.2.5.2 Preparação da suspensão bacteriana.....	107
2.2.5.3 Microdiluição.....	107
2.2.6 Análise estatística.....	107
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	107
3.1 Avaliação dos rendimentos.....	107
3.2 Perfil de ácidos graxos por RMN.....	109
3.3 Caracterização dos óleos da goji berry por espectroscopia de Raman.....	113
3.4 Atividade antioxidante.....	115
3.5 Atividade antimicrobiana.....	118
CONCLUSÃO.....	120

<b>CONCLUSÕES FINAIS.....</b>	<b>121</b>
-------------------------------	------------

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>122</b>
-------------------------	------------

## INTRODUÇÃO GERAL

As goji berry são frutas principalmente cultivadas em países asiáticos e altamente utilizadas para fins medicinais. No Brasil, estas frutas ainda não são cultivadas e consideradas como um “novo alimento”.

A medicina tradicional considera as goji berry como superfrutas, devido a elevada atividade antioxidante atribuída a uma ampla quantidade de metabólitos secundários (ácido ascórbico, carotenoides e compostos fenólicos). Grande quantidade dos metabólitos secundários desempenham funções antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias e antimicrobianas, e apresentam aplicações biotecnológicas e farmacológicas importantes.

Entretanto, a goji berry é mais comumente consumida na forma seca e o processo de secagem pode ocasionar acúmulo de metais pesados provenientes de agrotóxicos, causando riscos à saúde. Com isso, países asiáticos têm investido fortemente no cultivo orgânico desta fruta, mas ainda é pouco conhecida e consumida nos demais países.

Fontes vegetais com elevado potencial antioxidante vêm sendo aplicadas nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética, desta forma, o conhecimento da composição nutricional, fitoquímica e biológica torna-se extremamente importante. O conhecimento dos processos de extração de compostos naturais também é indispensável para aplicações industriais, pois tem como finalidade reduzir custo e tempo, além da obtenção de um produto com as características nutricionais e biológicas desejáveis.

Neste contexto, decidiu-se realizar o estudo nutricional, fitoquímico e biológico das goji berry cultivadas no sistema orgânico e convencional devido a tendência atual de consumo *in natura*, processada, como cápsulas e pó, e fabricação de produtos que utilizam esta superfuta, tais como, iogurtes, barras de cereais, sopas e bebidas. Portanto, as indústrias, entre elas, alimentícia, farmacêutica e cosmética, têm a necessidade de uma caracterização mais detalhada e um estudo das possíveis aplicações desta fruta.

## OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo determinar a composição nutricional e fitoquímica, além da avaliação do potencial biológico *in vitro* de frutas *Lycium barbarum* L. cultivadas nos sistemas orgânico e convencional.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição nutricional e parâmetros sensoriais de frutas *Lycium barbarum* L. orgânicas e convencionais: umidade, cinzas, minerais e metais pesados, proteínas, lipídeos, açúcares totais, açúcares solúveis e ácidos orgânicos por CLAE-IR, fibra alimentar, acidez titulável, pH, sólidos solúveis, atividade de água e cor.
- Otimizar a extração de compostos fenólicos da goji berry orgânica utilizando metodologia de superfície de resposta (MSR), avaliar o perfil fenólico por CLUE, e o efeito da proteção oxidativa no óleo de soja.
- Avaliar frutas goji orgânicas e convencionais quanto a: diferentes métodos de extração e de determinação de fenólicos totais, além da atividade antioxidante, carotenoides e ácido ascórbico (L-ascórbico e L-dehidroascórbico) por CLAE-IR, e atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos fenólicos.
- Avaliar o rendimento, composição de ácidos graxos por RMN, carotenoides por espectroscopia de Raman, e atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos de frutas *Lycium barbarum* L. orgânicas e convencionais extraídos por diferentes métodos: Soxhlet, Maceração e Bligh & Dyer.

## CAPÍTULO I

---

### Revisão da literatura

## 1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão apresentados tópicos sobre a goji berry, os principais metabólitos produzidos (primários e secundários) e suas funcionalidades. Em seguida, serão abordadas as principais atividades biológicas da goji berry: atividade antioxidante e antimicrobiana.

### 1.1 GOJI BERRY (*Lycium barbarum* L.)

#### 1.1.1 Classificação científica

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Solanales

Família: Solanaceae

Gênero: *Lycium*

Espécie: *Lycium barbarum*

#### 1.1.2 Origem e distribuição geográfica

*Lycium* spp. é uma planta solanácea, cresce até 3 m de altura e geralmente é encontrada na China e Tibet, e em algumas regiões da Ásia, América do Norte e do Sul, África e Austrália (POTTERAT, 2010). Existem aproximadamente 70 espécies de *Lycium* em regiões distintas distribuídas principalmente em países asiáticos (FUKUDA, YOKOYAMA e OHASHI, 2001).

A espécie *Lycium barbarum* L. é bastante cultivada e tem sido utilizada a mais de 2500 anos em países asiáticos para fins medicinais (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011). A origem não está estabelecida, mas acredita-se que tenha originado na Bacia do Mediterrâneo (GENAUST, 1996).

No Brasil, frutas *Lycium* ainda não são cultivadas e como não há histórico de consumo como alimento na dieta regular, a Resolução n°. 16 de 30 de abril de 1999 da

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) caracteriza esta espécie como um novo alimento ou um novo ingrediente (BRASIL, 1999).

### 1.1.3 Aspectos morfológicos

Os frutos desta espécie têm de 1 a 2 cm de largura, são elipsoides com ápice agudo e apresentam coloração vermelho-alaranjado brilhante (**Figura 01**) (POTTERAT, 2010; AMAGASE e FANSWORTH, 2011). Outra espécie com grande importância medicinal é a *Lycium chinese* Miller, a qual apresenta estrutura e anatomia similar a *Lycium barbarum* L. (DONNO *et al.*, 2014).



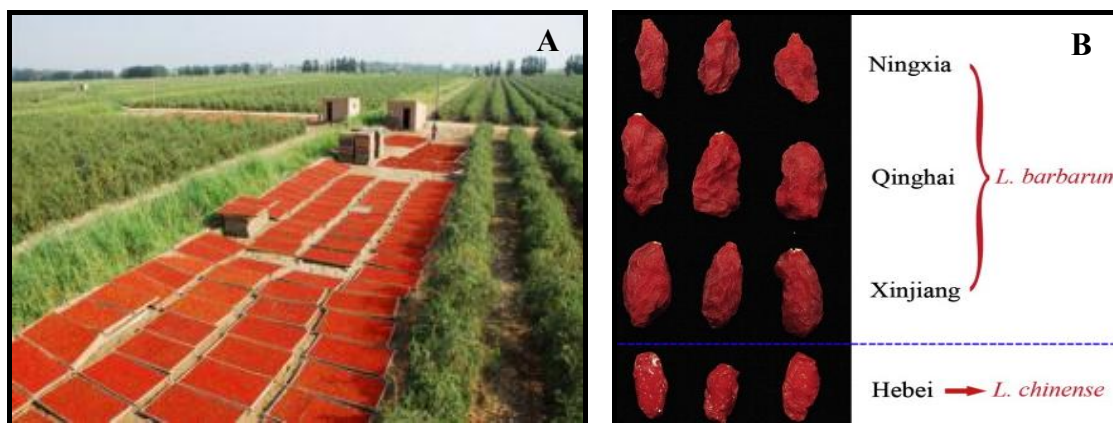
**Figura 01** Flores e frutos da *Lycium barbarum* L.

Fonte: Adaptado de Amagase e Farnsworth (2011).

As denominações mais comumente encontradas para os frutos de *Lycium* são “goji berry”, “wolfberry”, “gou-qi-zi” e “fructus Lycii”. O termo “goji” é uma adaptação de uma série de palavras nativas, e foi criada por pesquisadores do Instituto de Pesquisas Botânicas Tanaduk, em 1973 (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011).

### 1.1.4 Formas de uso e características mercadológicas

Frutas goji são largamente consumidas em todo o mundo e mais comumente encontradas na forma seca. A secagem tem por finalidade melhorar a logística de exportação e consiste na coleta das frutas no verão e outono. Inicialmente, as frutas são secas à sombra para o enrugamento da pele, e então expostas ao sol (**Figura 02**) até a pele ficar seca e a polpa macia (PDR, 2007).



**Figura 02** Secagem de goji berry ao sol (A), Frutas secas de *L. barbarum* L. e *L. chinense* Miller de diferentes regiões da China (B).

Fonte: (A) Amagase e Farnsworth (2011); (B) Xin *et al.* (2013).

O mercado da goji berry tem expandido significativamente. O total das exportações desta fruta *in natura* na China, principal fornecedor, gerou 120 milhões de dólares em 2010, derivado de uma produção de 95 mil toneladas (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011).

A goji berry é mais comumente comercializada seca, mas também pode ser processada em pó e cápsulas. É também encontrada em produtos alimentares convencionais, tais como iogurtes, bebidas, barras de cereais e sopas, e é adicionada como condimento em carnes, vegetais e arroz (POTTERAT, 2010). Frutas goji são também muito utilizadas na formulação de cosméticos e fármacos.

Um problema relacionado à secagem das frutas goji é a possível toxicidade por metais pesados e pesticidas. Em 2010, amostras de goji berry secas comercializadas na Espanha foram analisadas pela Organização de Consumidores e Usuários (OCU). Dez amostras foram detectadas com metais pesados como chumbo, cádmio e cobre além de pesticidas proibidos pela União Européia (SALGADO, 2011). Segundo a Agência de Segurança Alimentar Espanhol (AESAN) o consumo destas amostras não é capaz de provocar intoxicação aguda, porém pode provocar em longo prazo intoxicação crônica (SALGADO, 2011).

No Brasil, a Anvisa concluiu que não há restrição a comercialização das goji berries secas, desde que cumpridas as determinações dos órgãos específicos relacionadas à importação ou ao cultivo da espécie no Brasil (ANVISA, 2015).

Portanto, devido aos possíveis riscos que resíduos químicos podem causar a saúde, países asiáticos como a China têm investido na produção orgânica de frutas goji

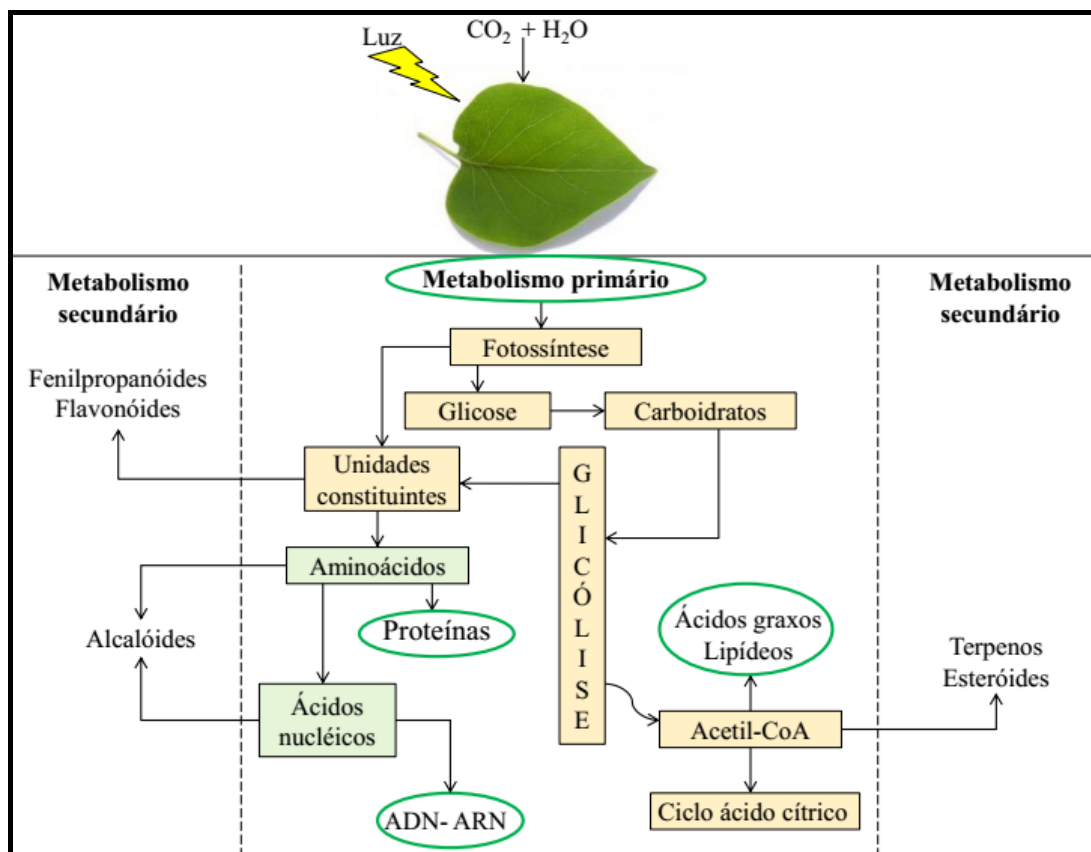
(LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2013). Alimentos orgânicos são isentos de fertilizantes químicos e pesticidas, drogas, hormônios e antibióticos (GOMIERO, PIMENTEL e PAOLETTI, 2011). Nos últimos anos têm aumentado mundialmente a demanda por alimentos orgânicos, sendo este seguimento um dos maiores mercados em crescimento na indústria de alimentos (HJELMAR, 2011). A expansão pode ser explicada pelo fato de alimentos orgânicos serem mais saborosos e saudáveis que os produzidos de forma convencional, além de proporcionar efeitos menos nocivos ao meio ambiente (ZANOLI, GAMBELLI e VAIRO, 2012).

### 1.1.5 Metabolismo vegetal

O metabolismo vegetal é definido como um conjunto de reações, catalisado por enzimas específicas, que através de rotas metabólicas ocasionam transformações das moléculas orgânicas, produzindo energia para suprir as exigências fundamentais da célula (PEREIRA e CARDOSO, 2012). Os metabólitos com importantes funções celulares podem ser classificados em primários e secundários.

Metabólitos primários estão relacionados com processos, tais como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Diferentemente, metabólitos secundários atuam na interação entre ambiente e planta, como agentes polinizadores e defensores químicos contra microrganismos e insetos (SEYFRIED *et al.*, 2016).

Como observado na **Figura 03**, compostos orgânicos sintetizados pelas plantas são metabólitos primários responsáveis pela síntese de açúcares, proteínas, lipídeos e outras substâncias importantes para a realização de funções vitais. A partir do metabolismo primário, metabólitos secundários são formados, como compostos fenólicos, alcaloides e isoprenóides (GARCÍA e CARRIL, 2009).



**Figura 03** Elementos básicos do metabolismo primário e secundário de plantas.

Fonte: Adaptado de García e Carril (2009).

Além das importantes funções celulares nas plantas, metabólitos secundários apresentam elevado potencial biológico no organismo humano. Características terapêuticas de plantas medicinais estão relacionadas com a presença de compostos bioativos com importantes atividades farmacológicas, oriundos do metabolismo secundário (SEYFRIED *et al.*, 2016).

Frutos e folhas da goji berry são considerados medicinais e são amplamente utilizados na medicina tradicional asiática. As frutas goji são consideradas “superfrutas”, devido ao elevado conteúdo de compostos bioativos e a relação destes com a redução do risco de doenças (AMAGASE e NANCE, 2008).

Plantas medicinais são utilizadas no tratamento de doenças pela medicina tradicional e popular há milhares de anos. Aproximadamente 70% da população de países subdesenvolvidos consomem diferentes partes destes vegetais, como folhas, caules, raízes, flores, frutos e sementes para fins terapêuticos (CALIXTO, 2005; SIMÕES, 2007). O grande interesse em plantas medicinais está relacionado, além das funções terapêuticas, com a baixa toxicidade e a viabilidade econômica.



## 1.2 METABÓLITOS PRIMÁRIOS DA GOJI BERRY

Metabolitos primários são substâncias químicas que participam principalmente do crescimento e desenvolvimento de plantas. Estes compostos apresentam funções importantes nas características organolépticas de frutas e vegetais, como sabor e aroma. Além de exercer funções celulares em plantas, metabolitos primários também são importantes na dieta para suprir a necessidade nutricional diária (SEYFRIED *et al.*, 2016).

Na goji berry alguns metabolitos primários, como carboidratos, principalmente açúcares, ácidos orgânicos e ácidos graxos, além da grande importância no desenvolvimento da planta, vêm sendo bastante estudados devido aos efeitos benéficos que podem proporcionar ao organismo humano (AMAGASE e FANSWORTH, 2011).

### 1.2.1 Carboidratos

A maior parte dos carboidratos encontrados na natureza ocorre na forma de polissacarídeo de alto peso molecular. Alguns são formas biológicas de reserva de monossacarídeos, outros são elementos estruturais de paredes celulares. Polissacarídeos presentes na parede celular dos frutos são degradados através da ação de enzimas durante o seu desenvolvimento e maturação. Estes compostos são glicoproteínas complexas que apresentam importante influência no sabor e aroma de frutas e vegetais (WU *et al.*, 2012).

Polissacarídeos estão entre os principais constituintes da goji berry, correspondendo a aproximadamente 23% do fruto seco (YIN e DANG, 2008). Análises cromatográficas mostraram que os polissacarídeos de frutas goji são constituídos por galactose, arabinose, glucose, ramnose, xilose e manose (YIN e DANG, 2008; HE *et al.*, 2012). Além disso, os três principais componentes que contribuem para o conteúdo total de açúcares em frutas goji maduras são a frutose, glucose e sacarose (TIAN *et al.*, 2015). Portanto, a biossíntese e o acúmulo de carboidratos podem ser influenciados pelo tipo e conteúdo de açúcares (ZHAO *et al.*, 2015).

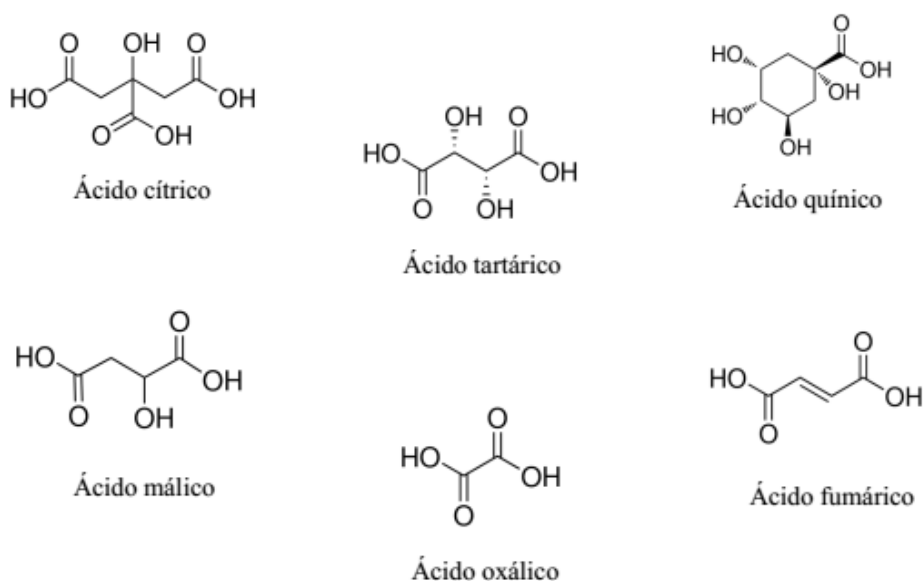
Diferentes estudos demonstram efeitos benéficos proporcionados à saúde por parte de polissacarídeos extraídos de frutas goji. Wang *et al.* (2010) observaram um efeito positivo de  $\beta$ -glucanas da goji berry sobre o sistema imunológico, através da elevada produção de linfócitos, células de defesa do organismo. No estudo realizado por Ho *et al.* (2010) a arabinose, galactose e ramnose derivadas de frutas goji exerceram

efeito inibitório na danificação celular sob a ação de homocisteína e glutamato. Níveis plasmáticos elevados destes compostos químicos estão relacionados com o aumento do risco da doença de Alzheimer, por danificar neurônios por apoptose induzida, fragmentação do DNA e fosforilação oxidativa. He *et al.* (2012) concluíram que a galactose e o ácido galacturônico provenientes da goji berry apresentam atividades anticarcinogênica, através da inibição do crescimento celular do câncer de mama (MCF-7), e antioxidante pela inibição da geração de espécies reativas de oxigênio.

### 1.2.2 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos são compostos de frutas e vegetais que participam do metabolismo primário de macromoléculas, tais como os carboidratos, lipídeos e proteínas. Estes ácidos são componentes importantes para a célula, na produção de energia e formação de precursores para a biossíntese de aminoácidos (LOPÉZ-BUCIO *et al.*, 2000). Os ácidos orgânicos são distintos de outros ácidos pelo grupo funcional COOH ao qual um grupo orgânico ou um átomo de hidrogênio podem estar ligados (CHERRINGTON *et al.*, 1991).

Assim como açúcares, ácidos orgânicos influenciam nas propriedades organolépticas de vegetais, além da manutenção da qualidade e do valor nutritivo. Durante a maturação do fruto, estes compostos químicos sofrem mudanças na natureza e na quantidade, e o monitoramento é importante para garantir as características organolépticas desejáveis (WU *et al.*, 2012). Os principais ácidos orgânicos identificados por Zhao *et al.* (2015) em diferentes estágios de desenvolvimento de frutas *Lycium barbarum* L. foram o cítrico, tartárico, quínico, málico, oxálico e fumárico (**Figura 04**).



**Figura 04** Principais ácidos orgânicos presentes em frutas *Lycium barbarum* L.

Fonte: Sigma Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com> (Acesso em 16 de setembro de 2017).

Ácidos orgânicos, como cítrico, málico e tartárico são utilizados como sanitizantes e aditivos na indústria alimentícia para a proteção e inibição de uma ampla variedade de microrganismos, pois são compostos naturais geralmente reconhecidos como seguros (GRAS) (DOORES, 1993). Estudos *in vitro* demonstram que estes ácidos orgânicos têm efeito bactericida contra *E. coli* O157:H7 (CONNER e KOTROLA, 1995), *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em vegetais frescos (AKBAS e ÖLMEZ, 2007).

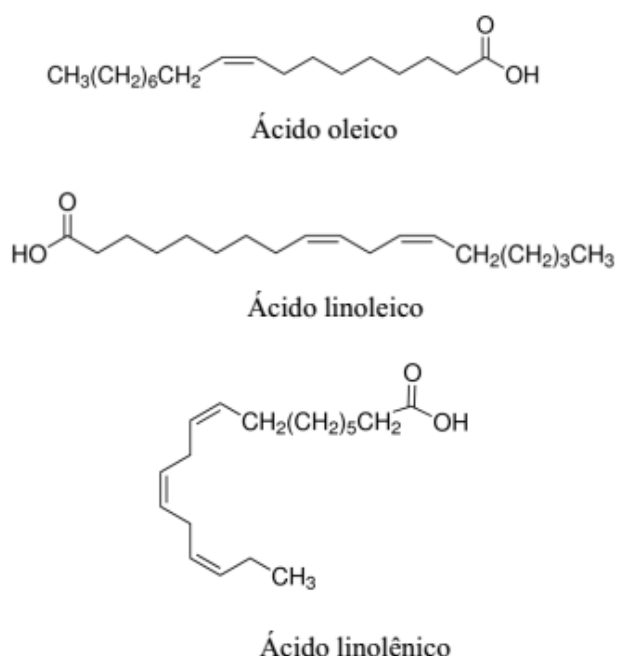
### 1.2.3 Ácidos graxos

Ácidos graxos são formados por ácidos monocarboxílicos com cadeias hidrocarbonadas de 4 a 36 átomos de carbono. São classificados conforme a extensão da cadeia: curta, de 4 a 8 átomos de carbono; média, de 8 a 12 carbonos e longa, mais de 12 átomos de carbono. Ácidos graxos de cadeias curtas e médias são especialmente encontrados em produtos de origem vegetal, enquanto que ácidos graxos de cadeias longas constituem muitas gorduras de origem animal. O grau de insaturação dos ácidos graxos é determinado pela presença ou não de duplas ligações na cadeia (OLIVEIRA, SANTOS e WILSON, 1982).

Ácidos graxos saturados não possuem nenhuma dupla ligação entre os átomos de carbono e são principalmente encontrados em gorduras animais. O ácido palmítico

(C16:0) é o ácido graxo saturado mais comumente encontrado em fontes vegetais (CHOW, 2008).

Os ácidos graxos insaturados apresentam duplas ligações na cadeia carbônica, e podem ser classificados em monoinsaturados (MUFAs), com apenas uma dupla ligação, e poliinsaturados (PUFAs), com duas ou mais duplas ligações. O ácido oleico (C18:1) é o MUFA mais amplamente distribuído na natureza, principalmente em sementes oleaginosas. Os principais PUFAs encontrados em fontes vegetais são os ácidos linoleico (C18:2) e linolênico (C18:3). Os ácidos, linoleico e linolênico são considerados essenciais e classificam-se em ômega 6 ( $\omega$ -6) e ômega 3 ( $\omega$ -3), respectivamente (OLIVEIRA, SANTOS e WILSON, 1982). A **Figura 05** mostra a estrutura química dos ácidos graxos insaturados, oleico, linoleico e linolênico.



**Figura 05** Principais ácidos graxos insaturados presentes em fontes vegetais.

Fonte: Sigma Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com> (Acesso em 02 de outubro de 2017).

Aproximadamente 90% da fração lipídica de frutas goji são compostos por ácidos graxos insaturados. O ácido linoleico ( $\omega$ -6) é o ácido graxo poliinsaturado predominante nas goji berries, corresponde aproximadamente a 70% do total de lipídeos (ENDES *et al.*, 2015; KULCZYŃSKI e GRAMZA-MICHAŁOWSKA *et al.*, 2016).

Fontes vegetais ricas de ácidos graxos insaturados, em especial os essenciais,  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, são extremamente importantes na dieta. Estudos demonstram que uma dieta equilibrada, com baixo teor de ácidos graxos saturados e maior teor de PUFAs, reduz o

nível de colesterol sanguíneo e consequentemente diminui o risco de doenças cardiovasculares (OLIVEIRA, SANTOS e WILSON, 1982). O estudo realizado por Maillard *et al.* (2002) demonstra que o equilíbrio entre os ácidos graxos  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6 na ingestão dietética apresenta diminuição do risco de câncer de mama.

### 1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA GOJI BERRY

Os metabólitos secundários desempenham importantes funções na interação entre planta e meio ambiente e são produzidos principalmente em resposta a condições externas adversas, como ataque de microrganismos, insetos e até mesmo outras plantas. São classificados em três classes principais: terpenos e terpenoides, compostos fenólicos e alcaloides (compostos nitrogenados) (CROTEAU *et al.*, 2000).

Grande parte dos metabólitos secundários apresenta destaque em aplicações biotecnológicas e farmacológicas e são considerados compostos bioativos (BERNHOF, 2010). Frutas são consideradas fontes ricas de compostos bioativos com importantes propriedades antioxidantes, antitumorais, anti-inflamatórias e antimicrobianas (PERTUZATTI *et al.*, 2015). Em frutas goji os principais compostos bioativos presentes são compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) e terpenos (carotenoides), além das vitaminas (ácido ascórbico).

#### 1.3.1 Compostos fenólicos

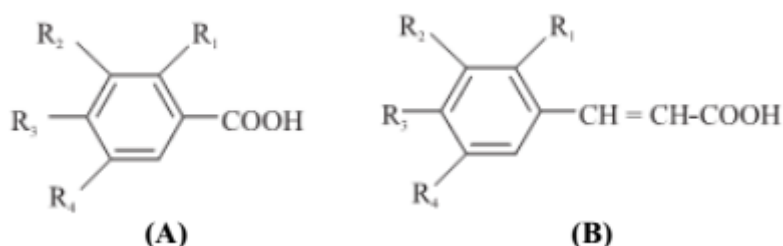
Os compostos fenólicos são os metabólitos secundários mais abundantes e com diferentes funções nas plantas. São sintetizados durante o desenvolvimento da planta, e também em resposta a diferentes situações de estresse, tais como infecções, ferimentos e radiação ultravioleta. Além disso, contribuem para as características organolépticas de frutas, vegetais e grãos, como cor, amargura, adstringência, *flavor*, odor e estabilidade a oxidação (DAI e MUMPER, 2010).

Compostos fenólicos são moléculas formadas por um ou mais anéis aromáticos com grupos hidroxila e apresentam como substituintes grupamentos metil, metoxil, amino e monossacarídeos (LIU, 2007). Trata-se de um grupo com mais de 8.000 estruturas atualmente conhecidas, variando de moléculas simples e substâncias altamente polimerizadas, e de grande importância medicinal (DAI e MUMPER, 2010).

O grupo dos compostos fenólicos é bastante heterogêneo devido à ampla variedade de rotas metabólicas das quais estes compostos podem ser gerados. Existem

duas rotas metabólicas de síntese de compostos fenólicos: do ácido chiquímico, a qual participa da biossíntese da maioria dos fenólicos de origem vegetal e do ácido malônico, que está atrelada a produção de fenóis provenientes de fungos e bactérias, sendo uma rota menos frequente em vegetais superiores (TAIZ e ZEIGER, 2004). A classificação de compostos fenólicos é de acordo com o número de anéis aromáticos que os constitui e os mais comumente encontrados em frutas e vegetais são os ácidos fenólicos e flavonoides.

Ácidos fenólicos constituem aproximadamente um terço dos compostos fenólicos e podem estar presentes nas plantas na forma livre ou ligada (HAMINIUK *et al.*, 2012). São divididos em dois grupos, os derivados do ácido hidroxibenzoico e os derivados do ácido hidroxicinâmico (**Figura 06**), ambos oriundos da rota do ácido chiquímico. O primeiro é composto por ácidos que possuem sete átomos de carbono (C6-C1), como gálico, vanílico, elágico e sirínico, comumente encontrados em frutas e vegetais. O segundo é constituído pelos ácidos caféico, clorogênico, *p*-cumárico, ferúlico e sinápico, formados por nove átomos de carbono (C6-C3) (SKINNER e HUNTER, 2013).



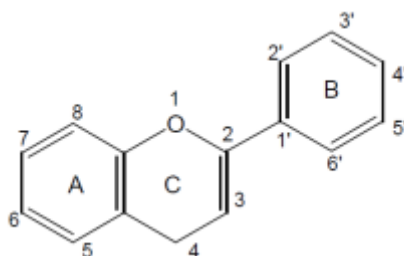
**Figura 06** Estrutura química dos dois grupos de ácidos fenólicos encontrados em frutas e vegetais: (A) ácido hidroxibenzoico e (B) ácido hidroxicinâmico.

Fonte: Adaptado de Ramalho e Jorge (2006).

Os principais ácidos fenólicos identificados em frutas *Lycium barbarum* L. foram o ácido clorogênico, em maior concentração, seguido pelos ácidos *p*-cumárico, ferúlico, vanílico, caféico e gálico (INBARAJ *et al.*, 2010; DONNO *et al.*, 2014). O ácido gentísico foi o principal ácido fenólico identificado por Duan, Chen e Chen (2010) em folhas da goji berry.

Os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem vegetal, e incluem a maioria das substâncias responsáveis pelo sabor, odor e cor característicos de frutas, folhas, sementes (IGNAT, VOLF e

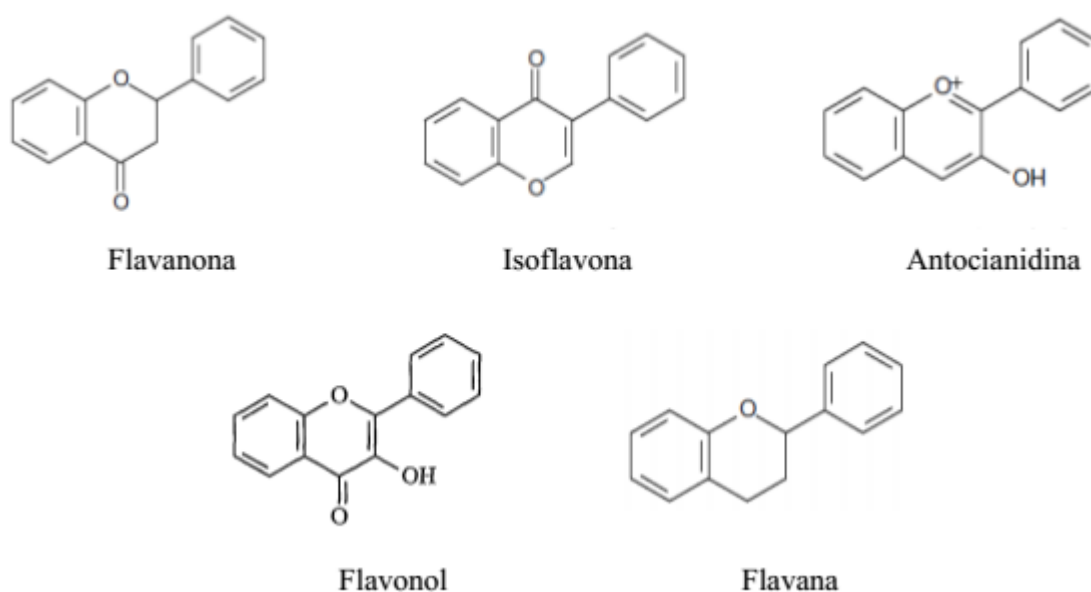
POPA, 2011). A estrutura química comum é o difenil propano, consiste em dois anéis aromáticos, A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico C (**Figura 07**).



**Figura 07** Estrutura química comum dos flavonoides.

Fonte: Balasundram, Sundram e Summan (2006).

As substituições no anel C resultam em classes de flavonoides (**Figura 08**), como flavanona, isoflavona, antocianidina, flavonol e flavana (INBARAJ *et al.*, 2010).



**Figura 08** Estrutura das principais classes de flavonoides.

Fonte: Pereira (2011).

Os principais flavonoides que constituem a maioria das cores de vegetais são: as flavanonas, hesperitina e naringenina; as antocianindinas, antocianinas (cianidina, pelargonidina e peonidina); os flavonóis, quercetina, kaempferol e rutina; e as flavanas, catequina e epicatequina (HAMINIUK *et al.*, 2012).

As goji berry apresentam elevada concentração de quercetina, sendo as principais a quercetina-ramno-di-hexose e a quercetina-3-*O*-rutinose (QIAN, LIU e HUANG, 2004; INBARAJ *et al.*, 2010), catequina e epicatequina (DONNO *et al.*, 2014). A rutina foi identificada como sendo o principal flavonoide presente em folhas de goji berry, enquanto que no fruto foram quantificados baixos teores deste composto (DUAN, CHEN e CHEN, 2010; DONG, LU e WANG, 2009). Segundo Belitz, Grosch e Schieberle (2009) fatores como grau de maturação, variedade, clima, composição do solo, localização geográfica e condições de armazenamento apresentam grande influência sobre o conteúdo e os tipos de compostos fenólicos disponíveis em frutas.

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que compostos fenólicos extraídos da goji berry apresentam efeito antioxidante na proteção da peroxidação lipídica e diminuição do estresse oxidativo, relacionados ao desenvolvimento de doenças, como o câncer (HUANG *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2003; FENG *et al.*, 2010). O estudo realizado por Chao *et al.* (2006) mostrou que extratos fenólicos de frutas *L. barbarum* inibiram a proliferação e causaram a morte de células de carcinoma hepatocelular humano (câncer de fígado).

Atividade antimicrobiana também foi observada para extratos fenólicos provenientes de frutas goji. O estudo realizado por Jin *et al.* (1995) reportaram o efeito antimicrobiano de extratos de frutas *L. barbarum* em diferentes tipos de bactérias: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A* e *C*, *Salmonella Typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae* e *E. coli*. Dahech *et al.* (2013) sugerem que goji berries são importantes fontes de agentes antimicrobianos, pois observaram efeito antibacteriano de fenólicos provenientes de frutas *Lycium shawii* em 11 cepas bacterianas, especialmente na *Salmonella enterica*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Micrococcus luteus*.

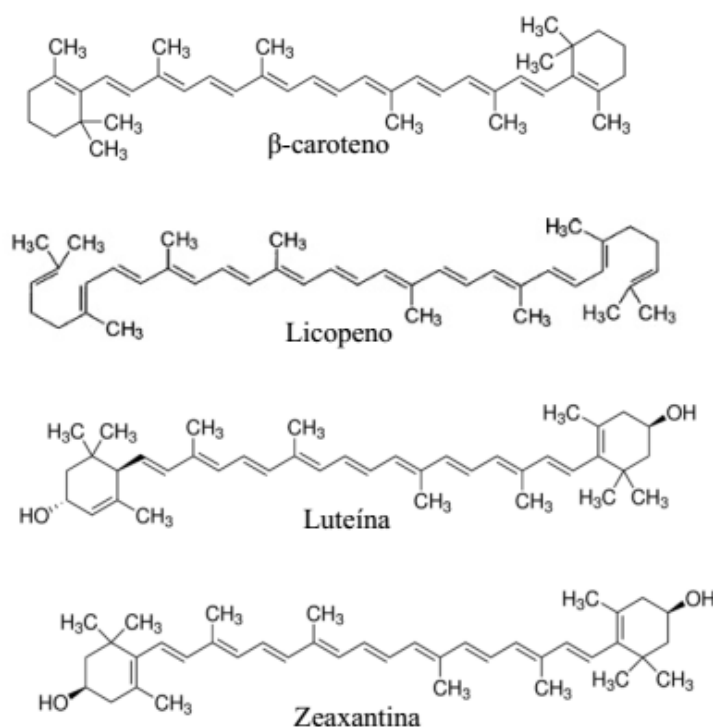
### 1.3.2 Terpenos (carotenoides)

Os carotenoides são isoprenóides, compostos lipossolúveis responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha de muitas plantas e produtos alimentícios, e precursores da vitamina A (DA SILVA *et al.*, 2014). São encontrados principalmente nos cloroplastos de plantas superiores, onde se associam às proteínas e atuam como pigmentos fotoprotetores na fotossíntese e estabilizadores de membranas (SILVA *et al.*, 2010).



Mais de 700 estruturas moleculares diferentes de carotenoides foram identificadas na natureza (FRASER e BRAMLEY, 2004).

Os carotenoides podem ser classificados em duas classes: carotenos ( $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno e licopeno) e xantofilas ( $\beta$ -criptoxantina, luteína e zeaxantina) (ROCK, 1997). Carotenos são compostos formados apenas por carbono e hidrogênio (hidrocarbonetos), enquanto que xantofilas são derivados oxigenados dos carotenos e podem conter funções hidroxil, ceto, epóxi, metoxi ou ácido carboxílico (FRASER e BRAMLEY, 2004). Em frutas e vegetais os principais carotenoides encontrados são  $\beta$ -caroteno, licopeno, luteína e zeaxantina (**Figura 09**).



**Figura 09** Estruturas dos principais carotenoides encontrados em frutas e vegetais.

Fonte: Sigma Aldrich, <http://www.sigmaaldrich.com> (Acesso em 27 de setembro de 2017).

Basicamente os carotenoides são formados por uma cadeia de polipropileno, um longo sistema de 3 a 15 ligações duplas conjugadas, formando uma “espinha dorsal” da molécula. Esta cadeia pode apresentar grupos terminais cíclicos contendo substituintes com átomos de oxigênio (SILVA *et al.*, 2010). Carotenoides são importantes compostos antioxidantes devido à presença de uma grande quantidade de elétrons livres na cadeia de polipropileno, os quais são capazes de interagir com espécies altamente reativas, como oxigênio singlete e radicais livres, e interromper reações oxidativas (FIEDOR e BURDA, 2014).

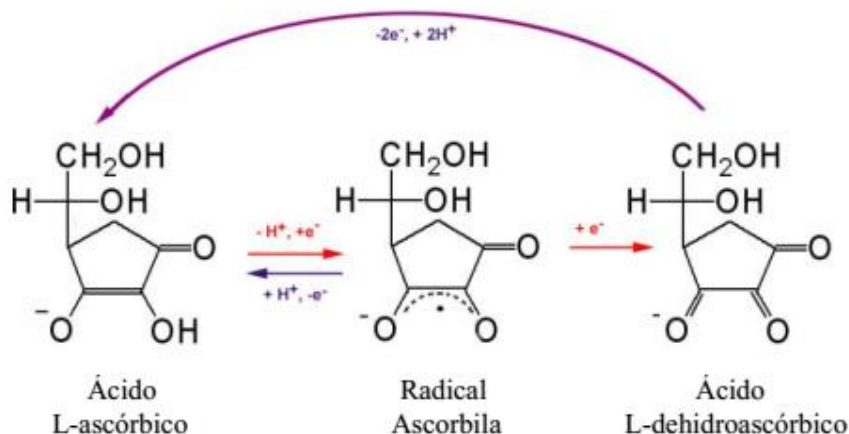
A zeaxantina foi reportada por ser o carotenoide predominante na goji berry. Em menor concentração foram identificados os carotenoides,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, violaxantina e luteína (INBARAJ *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2013). A zeaxantina é um carotenoide bastante estudado devido aos efeitos biológicos proporcionados ao organismo humano. É um pigmento que se acumula na retina dos olhos e protege contra a degeneração macular ocasionada pelo envelhecimento (SNODDERLY, 1995). Este carotenoide tem também relação com a redução do risco de desenvolvimento de catarata, principal causa da perda gradual da visão em idosos (MOELLER, JACQUES e BLUMBERG, 2000).

#### 1.4 VITAMINAS DA GOJI BERRY

Vitaminas são compostos orgânicos que não podem ser sintetizados pelo organismo humano e devem ser ingeridos para prevenir desordens metabólicas. A deficiência de algumas vitaminas aumenta o risco de desenvolvimento de doenças crônicas como câncer, doença cardiovascular e osteoporose (ZHANG *et al.*, 2011).

Frutas e folhas de *Lycium barbarum* L. e *Lycium chinese* apresentam elevada concentração de vitamina C (ácido ascórbico) (YAO *et al.*, 2011). Esta vitamina é considerada antienvhecimento devido à capacidade de eliminação de espécies altamente reativas do organismo, como oxigênio singlete, ânion superóxido e outros compostos de oxigênio ativo (PRICE *et al.*, 1999). Frutas goji apresentam também, em menor concentração, vitaminas do complexo B: B1, B2 e B6 (YAO *et al.*, 2011).

A vitamina C é hidrossolúvel, lábil (sensível a condições oxidativas ou térmicas) e amplamente distribuída em produtos de origem vegetal, principalmente em frutas cítricas e folhas verdes (ZHANG e HAMAUZU, 2004). Ocorre naturalmente na sua forma reduzida, ácido L-ascórbico, e a oxidação desta molécula converte a mesma em ácido L-dehidroascórbico. Como observado na **Figura 10**, a oxidação do ácido L-ascórbico por um elétron ( $e^-$ ) forma o radical ascorbila e que ao ser oxidado, gera o ácido L-dehidroascórbico. Tal processo é reversível, portanto o ácido L-dehidroascórbico quando ingerido é reduzido completamente em ácido L-ascórbico pelo organismo (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).



**Figura 10** Oxidação reversível do ácido L-ascórbico em ácido L-dehidroascórbico.

Fonte: Adaptado de Cerqueira, Medeiros e Augusto (2007).

A goji berry tem elevada concentração de vitamina C com importantes ações biológicas. O estudo realizado por Zhang *et al.* (2011) demonstrou que a vitamina C proveniente de frutas goji induz a morte de células tumorais do tipo Hela - adenocarcinoma cervical. Além disso, como a vitamina C é um nutriente que não pode ser metabolizado pelo organismo, a ingestão de alimentos ricos em vitamina C, como a goji berry, é fundamental na síntese de compostos essenciais para o funcionamento celular.

## 1.5 FUNCIONALIDADES DE COMPOSTOS BIOATIVOS

### 1.5.1 Atividade antioxidante

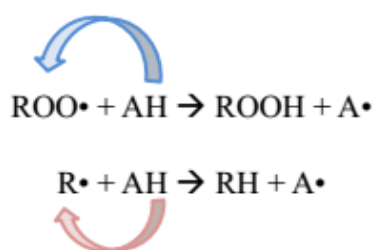
Compostos bioativos além da função importante na dieta, como nutrientes essenciais, apresentam também ação antioxidante, impedindo a formação e a eliminação de radicais livres ou reparação de danos oxidativos (RAMFUL *et al.*, 2010).

Radicais livres podem ser provenientes de fontes endógenas como, metabolismo natural de células aeróbicas, reações inflamatórias e enzimáticas, ou de fontes exógenas como, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta e tabagismo (BIANCHI e ANTUNES, 1999). Estes radicais são produzidos principalmente na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS), com um ou mais elétrons desemparelhados em orbitais atômicos ou moleculares (LIU *et al.*, 2014). As espécies nocivas reativas mais comumente existentes no organismo são os radicais alquilperoxil (ROO•), hidroxil

(HO•), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) e peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) (SKINNER e HUNTER, 2013).

Quando há um desequilíbrio no organismo, pela excessiva produção de radicais livres e baixa produção de mecanismos de defesa, ocorre o chamado estresse oxidativo (VALKO *et al.*, 2006). O excesso de radicais livres ocasiona danos aos lipídeos, aminoácidos das proteínas, dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e bases do DNA, responsáveis pelo envelhecimento, doenças crônicas e degenerativas (LIU *et al.*, 2014). Compostos bioativos podem reduzir a severidade do estresse oxidativo, evitando lesões e perda da integridade celular (HUANG, OU e PRIOR, 2005).

O mecanismo de ação dos antioxidantes (AH) ocorre por meio da doação de um átomo de hidrogênio ativo aos radicais livres (ROO• e R•), conforme **Figura 11**. São formados compostos inativos para iniciar uma reação em cadeia (ROOH e RH) e um radical inerte (A•) procedente do antioxidante (HUANG, OU e PRIOR, 2005). Os compostos com efeito antioxidante apresentam na sua estrutura elétrons pi (π) deslocalizados, e não apresentam a capacidade de iniciar ou propagar reações oxidativas (MIRA *et al.*, 2009).



**Figura 11** Mecanismo de ação de compostos antioxidantes.

Fonte: Adaptado de Huang, Ou e Prior (2005).

Portanto, uma dieta rica em produtos de origem vegetal ocasiona um excesso de antioxidantes redutores no organismo. A presença destes compostos é extremamente importante para a diminuição à adaptação ao estresse oxidativo. Além disso, reduzem metais de transição livres, potentes catalisadores de reações em cadeia iniciadas por radicais livres (CERQUEIRA, MEDEIROS e AUGUSTO, 2007).

As goji berries têm elevada concentração de compostos bioativos com importantes funções biológicas no organismo. Compostos fenólicos e carotenoides são os principais responsáveis pelas propriedades medicinais de frutas goji (AMAGASE e FANSWORTH, 2011). Os resultados obtidos por Amagase, Sun e Borek (2009)

mostraram que o consumo do suco de goji berry durante 30 dias preveniu e reduziu os danos oxidativos ocasionados por radicais livres no organismo.

Em indústrias alimentícias, antioxidantes sintéticos são muito utilizados, como butil-hidroxianisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propil galato (PG). Porém, podem ocasionar riscos à saúde, associados à toxicidade. Por este motivo, o interesse por compostos antioxidantes de fontes naturais têm aumentado não somente na indústria alimentícia, mas também nas indústrias farmacêutica e cosmética (AZMIR *et al.*, 2013).

O processo de extração é extremamente importante para obtenção de um composto antioxidante com as características biológicas desejadas. Fatores intrínsecos da matriz vegetal e extrínsecos, como solvente, temperatura, pressão e tempo podem afetar positivamente a qualidade e o rendimento do extrato (HERNÁNDEZ, LOBO e GONZÁLES, 2009). A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma técnica estatística bastante utilizada que avalia diferentes fatores e a interação entre eles, com o objetivo de otimizar processos através de modelos matemáticos. A otimização de processos industriais são extremamente importantes para diminuição de custos e tempo (YE e JIANG, 2011).

A avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais é extremamente importante para a aplicação na indústria alimentícia e pode ser realizada através de métodos químicos e testes celulares *in vitro* (HAMINIUK *et al.*, 2012).

A atividade antioxidante *in vitro* é baseada em dois mecanismos de transferência: (i) de átomos de hidrogênio e (ii) de elétrons. Atualmente preconiza-se a utilização de dois ou mais métodos, pois nenhum ensaio isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente na “atividade antioxidante total” de uma amostra (PRIOR e CAO, 1999). Os métodos mais comumente utilizados são: capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC), potencial total reativo do antioxidante (TRAP), capacidade de sequestro de radicais ABTS<sup>•+</sup>, capacidade antioxidante equivalente em Trolox (TEAC), poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e capacidade de sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> (BADARINATH *et al.*, 2010). Os ensaios de DPPH<sup>•</sup>, ABTS<sup>•+</sup> e FRAP serão detalhadamente descritos, os quais foram utilizados neste trabalho.

O DPPH<sup>•</sup> é um radical de nitrogênio orgânico, estável de cor violeta. A coloração deste radical na presença de um doador de átomos de hidrogênio ou elétron (antioxidante) é reduzida ao longo da reação, tornando-se amarela, de acordo com o

número de elétrons capturados. A perda da coloração pode ser observada pelo decréscimo da absorbância (NOIPA *et al.*, 2011).

A metodologia de sequestro do radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é um ensaio colorimétrico cujos radicais  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  descolorem na presença de antioxidantes. Um radical cátion estável de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é formado pela oxidação química deste radical com persulfato de potássio. Assim como no ensaio de  $\text{DPPH}^{\bullet}$ , a atividade antioxidante é determinada pela descoloração da solução, através do sequestro ânion radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (RE *et al.*, 1999).

No método de FRAP, a capacidade antioxidante é avaliada a partir da habilidade que o antioxidante apresenta em reduzir o íon  $\text{Fe (III)}$  do complexo de 2,4,6-tripiridil-triazina- $\text{Fe(III)}$  a  $\text{Fe(II)}$ . Esta redução em meio ácido altera a cor da solução, de amarelo para azul intenso, pela formação de íons ferrosos (BENZIE e STRAIN, 1996).

### 1.5.2 Atividade antimicrobiana

Muitas espécies vegetais têm sido utilizadas como produtos terapêuticos. Produtos terapêuticos apresentam elevada concentração de compostos bioativos com elevado potencial antioxidante e antimicrobiano. Compostos fenólicos são fitoquímicos com efeitos ativos sobre diferentes microrganismos patogênicos (NASCIMENTO *et al.*, 2000). A diversidade estrutural de compostos derivados de plantas é imensa, e o impacto da ação antimicrobiana depende da configuração estrutural.

Os compostos fenólicos apresentam um grupo ativo OH, que promove a ação inibitória através da ruptura da membrana celular da bactéria, com perda de componentes celulares (XUE, DAVIDSON e ZHONG, 2013). A hidroxila promove deslocalização de elétrons, que então atuam como permutadores de prótons, reduzindo o gradiente através da membrana citoplasmática das células bacterianas. Isto irá ocasionar colapso da força motriz do próton e esgotamento da reserva de ATP, levando a morte celular (ULTEE, BENNIK e MOEZELAAR, 2002).

O uso indiscriminado de antibióticos no tratamento de doenças vem aumentando, e apesar das indústrias farmacêuticas produzirem um expressivo número de novos antibióticos, a resistência microbiana a esses fármacos também aumentou. Portanto, necessita-se adotar medidas para enfrentar o problema, no controle do uso de antibióticos, nas pesquisas relacionadas aos mecanismos genéticos da resistência microbiana e às novos fármacos sintéticos e naturais (NASCIMENTO *et al.*, 2000).

Extratos brutos ou compostos biologicamente ativos isolados de espécies vegetais são fontes promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos (AL-FATIMI *et al.*, 2007). Segundo a Organização Mundial de Saúde, plantas medicinais podem ser consideradas a melhor fonte para obtenção de fármacos naturais.

Diferentes fontes vegetais vêm sendo estudadas quanto a suas propriedades terapêuticas, segurança e eficácia. Hossain *et al.* (2014) estudaram o efeito antimicrobiano de extratos fenólicos de frutas *Datura metel* L. e observaram efeito antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Agourram *et al.* (2013) observaram que extratos de cascas de romã e maçã apresentaram efeito inibitório no crescimento de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* e *Yersinia enterocolitica*. Diferentes espécies de goji berry apresentam efeito inibitório no crescimento de diferentes tipos de bactérias, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* e *Listeria monocytogenes* (JIN *et al.*, 1995; DAHECH *et al.*, 2013).

Extratos de plantas também podem ser utilizados como aditivos antimicrobianos naturais em alimentos. Podem ser utilizados em combinação com outros conservantes naturais, produzindo efeito sinérgico contra agentes patogênicos. Xi *et al.* (2011) investigaram o efeito da *cranberry* em pó sobre a *Listeria monocytogenes* em carnes. Os resultados mostraram redução do crescimento bacteriano de 1-3% quando comparado ao conservante sintético nitrito. O extrato etanólico do bagaço de uva, estudado por Sagdic *et al.* (2011), inibiu o crescimento da *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, bolores e leveduras em amostras de carne.

## CAPÍTULO II

---

### **Propriedades nutricionais e sensoriais da goji berry (*Lycium barbarum* L.) cultivada no sistema orgânico e convencional**

#### **RESUMO**

Frutas goji berry são consumidas em todo o mundo, devido ao elevado conteúdo de nutrientes. São amplamente cultivadas em países asiáticos e a espécie *Lycium barbarum* L. é uma das mais cultivadas. Os conteúdos de umidade, cinzas e metais pesados, minerais, proteínas, lipídeos, carboidratos disponíveis, açúcares solúveis e fibras alimentares (solúveis e insolúveis) foram determinados em frutas goji cultivadas nos sistemas orgânico e convencional. Características sensoriais como acidez titulável, pH, sólidos solúveis, atividade de água, cor e ácidos orgânicos também foram investigadas. Parâmetros nutricionais e sensoriais foram significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre a goji berry orgânica e convencional. Frutas orgânicas e convencionais apresentaram elevados conteúdos de açúcares totais disponíveis (67,85 e 75,05%), fibras alimentares (9,88 e 11,27%) e minerais essenciais (Mg, Fe, Zn, Cu e Mn). As concentrações dos metais pesados Cd, Hg e Pb para frutas orgânicas foram abaixo do limite máximo estabelecido pela Codex Alimentarius. Frutas convencionais apresentaram conteúdo de Hg e Pb (0,16 e 0,15 mg/kg, respectivamente) acima dos limites estabelecidos. A frutose foi o principal açúcar solúvel identificado nas frutas orgânica e convencional (5,45 e 4,92 g/100 g, respectivamente), seguido pela glicose e sacarose. O ácido cítrico foi identificado como principal ácido orgânico presente na goji orgânica e convencional (0,90 e 1,14 g/100 g, respectivamente), seguido pelos ácidos oxálico, tartárico, fumárico, málico e quínico. Os parâmetros, acidez titulável, pH, sólidos solúveis foram considerados desejáveis sensorialmente nas duas amostras. A atividade de água foi baixa (0,34 e 0,37) e a coloração vermelha-alaranjada foi predominante. Estes resultados demonstram que frutas goji apresentam elevado potencial nutricional e sensorial como ingredientes na formulação de alimentos, cosméticos e medicamentos. Porém, frutas goji cultivadas em sistemas orgânicos são melhores alternativas para garantir a segurança alimentar de produtos industrializados.

**Palavras-chave:** nutrientes, parâmetros sensoriais, metais pesados, segurança alimentar.

#### **1 INTRODUÇÃO**

As frutas desempenham papel importante na dieta, pois são fontes ricas de nutrientes essenciais, como vitaminas, minerais e fibras. Além disso, atraem o consumidor por suas características organolépticas, como sabor, odor e aroma (MARTINEZ-VALVERDE, PERIAGO e ROS, 2000).



As *berry fruits* são pequenas frutas comercializadas comumente frescas ou processadas. Estas frutas vêm sendo muito consumidas em todo o mundo, pois apresentam um elevado conteúdo de nutrientes, que além de suprirem as necessidades metabólicas, proporcionam um impacto positivo na saúde humana (de SOUZA *et al.*, 2014). Entre as *berry fruits*, as goji berries vêm ganhando importância em diferentes países do mundo. Frutas goji pertencem à família Solanaceae e ao gênero *Lycium* spp, e a espécie *Lycium barbarum* L. é uma das mais cultivadas na China, Tibet e Ásia. Os frutos da goji berry podem apresentar coloração laranja ou vermelha, são elipsoides e o tamanho varia de 1 a 2 cm de comprimento (POTTERAT, 2010).

Frutas *L. barbarum* são consideradas fontes de minerais e vitaminas essenciais, que juntamente com as propriedades organolépticas tornam estas frutas desejáveis para o consumo (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011). A combinação do conteúdo de açúcares totais e ácidos orgânicos é responsável por suas apreciáveis características sensoriais. Tais características impulsionaram a comercialização diversificada da goji berry, na forma *in natura*, seca e encapsulada, e na formulação de iogurtes, bebidas, barras de cereais, chocolates, bebidas e sopas (POTTERAT, 2010).

A forma seca da goji berry é a mais comumente consumida. Porém, no cultivo convencional a aplicação de agrotóxicos é elevada e o processo de secagem pode ocasionar acúmulo de metais pesados provenientes dos agrotóxicos. Em longo prazo, o consumo de vegetais com resíduos químicos pode provocar uma intoxicação crônica e o desenvolvimento de doenças, como o câncer (SALGADO, 2011). A grande preocupação com os possíveis riscos à saúde impulsionou o cultivo orgânico de frutas goji em países asiáticos (LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2013).

No cultivo orgânico não há utilização de fertilizantes químicos, hormônios e antibióticos. A adoção de práticas orgânicas vem atraindo a atenção do setor alimentício, pois proporciona o equilíbrio ambiental e preservação da biodiversidade, além de produzirem alimentos mais seguros e nutritivos que os seus homólogos convencionais (GOMIERO, PIMENTEL e PAOLETTI, 2011). A influência de distintos sistemas de cultivo na composição nutricional de frutas como *blueberry* (WANG *et al.*, 2008), morango, acerola (CARDOSO *et al.*, 2011) e maracujá amarelo (PERTUZATTI *et al.*, 2015) já foi estudada. No entanto, nenhum estudo foi encontrado sobre a variabilidade na composição de macro e micronutrientes de frutas goji produzidas com diferentes técnicas de cultivo. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar as características nutricionais de frutas goji cultivadas no sistema orgânico e convencional,

com a finalidade de uma melhor aplicação desta fruta em diferentes produtos da indústria alimentícia.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

#### **2.1.1 Reagentes**

Os ácidos, nítrico ( $\text{HNO}_3$ ), perclórico ( $\text{HClO}_4$ ), meta-fosfórico ( $\text{HPO}_3$ ) e sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) foram adquiridos da Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Padrões químicos de grau cromatográfico (pureza  $\geq 95\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O solvente hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ) foi adquirido da Neon (Suzano, SP, Brasil). O etanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), acetonitrila ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$ ) e acetona ( $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ) foram adquiridos da J.T.Baker (Loughborough, EUA). O reagente de antrona foi adquirido da Merck Millipore (Burlington, Massachusetts, EUA). A água ultrapura (Milli-Q) foi utilizada em todos os experimentos.

#### **2.1.2 Amostra**

As amostras secas de goji berry, convencional e orgânica, foram adquiridas no Mercado Municipal de Curitiba/PR, safra 2015. Certificado Orgânico: IMO Control, Manufaturado: Qingdao Ri Tai Food Co., Ltd. As frutas foram embaladas em sacos de polietileno, congeladas a  $-18 \pm 2^\circ\text{C}$  e posteriormente liofilizadas (L101-Liotop, São Carlos – São Paulo, Brasil). Por fim, as amostras foram trituradas em um moinho analítico a 10 mesh (MA630/1-Marconi, Piracicaba – São Paulo, Brasil) e armazenadas em embalagens de vidro âmbar a  $4 \pm 2^\circ\text{C}$  até o momento das análises.

### **2.2 MÉTODOS**

#### **2.2.1 Umidade**

A umidade das amostras foi determinada de acordo com a AOAC (1997), por desidratação até peso constante em estufa a  $100 \pm 2^\circ\text{C}$ . Por fim, a porcentagem de umidade das amostras foi calculada.

### 2.2.2 Cinzas e metais pesados

O método da incineração em mufla foi empregado para a determinação de cinzas nas amostras de goji berry (AOAC, 1997). Uma amostra de 0,5 g de goji berry liofilizada foi incinerada a alta pressão em forno de micro-ondas (MLS1200, Muffle Furnace – Milestone, Guéldria, Holanda) a  $550 \pm 4$  °C durante 24 h, no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). O resíduo da incineração foi pesado para determinação da porcentagem de cinzas. Então, as amostras incineradas foram encaminhadas para o Instituto de Toxicología de La Defensa (Madrid, Espanha) para análises de metais pesados (cádmio (Cd), mercúrio (Hg) e chumbo (Pb)).

### 2.2.3 Composição mineral

A determinação de macro e micronutrientes das amostras foi realizada por digestão nitro-perclórica (NOGUEIRA e SOUZA, 2005) na Embrapa – Núcleo de solos e ciclos biogeoquímicos, Laboratório de Nutrição Florestal e Água (Curitiba/PR). Aproximadamente 0,2 g de amostra liofilizada foi digerida com 4 mL de HNO<sub>3</sub> concentrado. Após a digestão, 0,5 mL de HClO<sub>4</sub> foram adicionados e aquecidos lentamente a  $200 \pm 2$  °C até a finalizar os vapores de óxido nitroso. Após o resfriamento das amostras, 20 mL de água purificada foram adicionados. As leituras para os minerais, ferro (Fe), cobre (Cu), manganês (Mn), zinco (Zn), sódio (Na) e potássio (K) foram realizadas diretamente no comprimento de onda adequado para cada elemento, utilizando as soluções-padrão para fins de calibração. Para determinação de fósforo (P), às amostras foram adicionados 0,2 mL de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> 5% (m/v) e 2,5 mL de solução ácida de molibdato de amônio diluída ((NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O). Cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram determinados pela diluição da amostra em 1 mL de La<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 5% (m/v) para cada 0,2 mL de amostra proveniente da digestão. Todas as leituras foram realizadas em um equipamento de absorção atômica (AAnalyst 200, Perkin-Elmer, Waltham, Massachusetts, EUA).

### 2.2.4 Proteínas

O conteúdo de proteínas foi determinado segundo método Kjeldhal como descrito em AOAC (1997). Aproximadamente 0,5 g de goji berry liofilizada foi digerida em ácido sulfúrico concentrado e em seguida, titulada com NaOH 0,1 mol/L. O teor de

nitrogênio total foi calculado e convertido em conteúdo de proteínas, através do fator de conversão de 6,25.

### **2.2.5 Lipídeos**

A extração foi realizada de acordo com Horwitz e Latimer (2005). Aproximadamente 10 g de amostra triturada foram adicionadas a 200 mL de hexano e mantidos em um sistema Soxhlet durante 4 h a  $60 \pm 2$  °C. Após a extração, o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo (Fisatom 802, São Paulo, SP, Brasil) sob pressão reduzida a  $50 \pm 2$  °C. O solvente residual foi evaporado em uma estufa com circulação forçada de ar a  $50 \pm 2$  °C durante 2 h. O resíduo foi pesado e o rendimento determinado. Os óleos foram transferidos para frascos âmbar, mantidos sob atmosfera de nitrogênio, selados e armazenados a -20 °C para análises posteriores.

### **2.2.6 Carboidratos disponíveis (açúcares totais)**

A quantificação dos açúcares totais foi realizada por colorimetria utilizando reagente de antrona (OSBORNE e VOOGT, 1986), no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). Pesou-se 0,5 g de amostra liofilizada, adicionou-se 15 mL de HClO<sub>4</sub> a 52% (v/v) e 10 mL de água destilada. Em seguida, a solução foi deixada em repouso por 24 h no escuro, filtrados e ajustados para 100 mL. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi adicionada a 5 mL do reagente de antrona a 0,1% (m/v), e aquecidos em banho maria por 12 min. Em seguida, foram resfriados e a absorbância determinada a 630 nm em um espectrofotômetro UV-Vis (ThermoFisher-Scientific, Genesys-105, Waltham, Massachusetts, EUA), a partir de uma curva padrão de glicose (0 – 300 µg/mL;  $y = 0,0049x + 0,0484$ ;  $R^2 = 0,9823$ ).

### **2.2.7 Açúcares solúveis**

A determinação de açúcares solúveis das amostras de goji berry foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de índice de refração (CLAE-IR), conforme metodologia descrita por Sánchez-Mata *et al.* (1998), no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). Foram pesados 0,5 g de amostra liofilizada em triplicata, adicionados 40 mL de etanol 80% (v/v) e mantidos sob agitação a  $60 \pm 2$  °C durante 45 min. O etanol foi

evaporado em um evaporador rotativo a vácuo (Büchi-R-114, MarshScientific, Cambridge, Massachusetts, EUA), ajustado para  $40 \pm 2$  °C e fez-se o concentrado para 25 mL com água destilada. As amostras foram então purificadas em cartuchos Sep-Pak C18 (Waters, Milford, Massachusetts, EUA), previamente lavados com 5 mL de metanol seguidos por 5 mL de água. Uma alíquota de 2 mL do filtrado foi misturado com 8 mL de acetonitrila e filtrados através de uma membrana PVDF 0,45 µm (Millipore, Bedford, Massachusetts, EUA). Em seguida, 100 µL de amostra foram injetadas no cromatógrafo (Micron Analítica, Madrid, Espanha) equipado com um detector refratômetro diferencial R401 (Jasco, Madrid, Espanha) e coluna Luna da Phenomenex (250 x 4,60 mm, 5 µm) (Torrance, Califórnia, EUA). A fase móvel consistiu em uma mistura de acetonitrila e água (80/20, v/v), a um fluxo de 0,9 mL/min. As áreas dos picos nos cromatogramas resultantes foram quantificadas por curva analítica de padronização externa de soluções padrões de frutose, glicose e sacarose.

#### **2.2.8 Fibras alimentares (insolúveis e solúveis)**

A determinação das fibras totais foi realizada através da quantificação das fibras insolúveis e solúveis (AOAC, 1997), no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). Pesou-se 0,5 g da amostra liofilizada, adicionou-se 50 mL de tampão fosfato 0,008 mol/L (pH 6) e 0,1 mL da enzima  $\alpha$ -amilase, permanecendo sob agitação à 100 °C por 15 min. A solução foi resfriada, e então foram adicionados 10 mL de NaOH 0,275 mol/L (pH 7,5) e 5 mg da enzima protease, mantidos sob agitação à 60 °C por 30 min. Em seguida foram adicionados 10 mL de HCl 0,325 mol/L (pH 4,5) e 0,1 mL de amiloglucosidase, mantidos também por 30 min. sob agitação à 60 °C. Para determinação das fibras insolúveis, as amostras foram imediatamente filtradas após o final das digestões, com 10 mL de água, 10 mL de etanol 98% (v/v) e 10 mL de acetona, e então mantidas em estufa a  $100 \pm 2$  °C por 24 h. As fibras solúveis foram determinadas através da precipitação com etanol 96° por 24 h. Em seguida, as amostras foram filtradas com 10 mL de etanol 78% (v/v), 10 mL de etanol 98% (v/v) e 10 mL de acetona e também foram mantidas em estufa a  $100 \pm 2$  °C por 24 h. As correções para matéria mineral e proteína foram feitas e a quantidade total de fibra alimentar, porção solúvel mais insolúvel foram calculadas.

### 2.2.9 Acidez titulável, pH, sólidos solúveis, atividade de água e cor

A acidez titulável (ATT) das amostras liofilizadas foi determinada por titulação com NaOH 0,1N até atingir o pH 8,1 (AOAC, 1997). As amostras liofilizadas de goji berry foram diluídas 1/10 (m/v) em água destilada para determinação do pH e sólidos solúveis totais (SST). O pH foi mensurado por potenciometria (MicroPH-2000, Crison Instrument, Barcelona, Espanha) e os SST totais através de refratometometria (PR-1, Atago CO., Tóquio, Japão). A atividade de água ( $A_w$ ) das amostras de goji berry foi determinada em um equipamento AQUAlab (BrasEq-Séries 3B, São José dos Campos – São Paulo, Brasil). A cor das amostras de goji berry foi determinada utilizando um colorímetro portátil (MiniScan XE Plus HUNTERLAB, Virgínia, EUA), luminosidade D65, com 8 mm de abertura.

### 2.2.10 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram comparadas quanto às características microscópicas de sua estrutura, por microscopia eletrônica de varredura, em aumentos de 260 vezes, no Centro de Microscopia Eletrônica (UFPR), utilizando um microscópio eletrônico de varredura (Jeol-JSM-6360LV, Akishima, Tóquio, Japão). Para cada uma das amostras, foram fixadas em suportes de cobre e metalizadas com uma camada de ouro de 350 Å de espessura, em aparelho a vácuo Polaron E5000.

### 2.2.11 Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos das amostras foram determinados por CLAE-IR, conforme descrito por Sánchez-Mata *et al.* (2012), no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). Em triplicata, pesou-se 0,5 g das amostras liofilizadas e adicionou-se 25 mL de ácido metafosfórico 4,5% (m/v), foram então mantidos no escuro sob agitação durante 15 min. Em seguida, os extratos foram filtrados em papel Whatman e em membrana de PVDF 0,45 µm. Por fim, 50 µL de amostra foram injetados em um cromatógrafo (Micron Analítica, Madrid, Espanha) equipado com um detector UV-visível (Thermo Separation Spectra Series UV100) e coluna Sphereclone ODS(2) Phenomenex (250 x 4,60 mm, 5 µm) (Torrance, Califórnia, EUA). A fase móvel consistiu em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,8 mmol/L (pH 2,6), com comprimento de onda de 215 nm e vazão de fluxo de 0,4 mL/min. As áreas dos picos nos cromatogramas resultantes foram quantificadas por curvas de calibração de soluções

padrões de ácido oxálico, tartárico, málico, quínico, cítrico e fumárico, a diferentes concentrações.

#### **2.2.12 Contribuição para a cota dietética recomendada (RDA - *Recommended dietary allowance*)**

Os resultados obtidos a partir da composição nutricional nas amostras de goji berry foram comparados com a cota dietética recomendada (RDA), segundo a *Food and Nutrition Board* (FNB), do *American Institute of Medicine of the National Academies* (TRUMBO *et al.*, 2002), a qual recomenda a quantidade de nutrientes necessária para atender às exigências de grande parte da população saudável (aproximadamente 98%) (MAHAN e ESCOTT-STUMP, 2010). A porção de 100 g de goji berry foi utilizada para avaliar a sua contribuição nas necessidades nutricionais humanas diárias.

#### **2.2.13 Análise estatística**

Os resultados foram expressos em médias  $\pm$  desvio padrão (DP). A análise estatística dos dados foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Fisher LSD, a 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ ). O teste *t-student* também foi utilizado para avaliar os dados e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o *software* Statistica 7.0 (StatSoft Inc. South America, Tulsa, Oklahoma, EUA).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A **Tabela 01** apresenta os resultados da composição macronutrientes, valor calórico e a contribuição para a cota dietética recomendada (RDA) das amostras de goji berry cultivadas nos sistemas, orgânico e convencional. Todos os parâmetros, exceto umidade e fibras solúveis, foram significativamente diferentes ( $p \leq 0,05$ ) entre as amostras orgânica e convencional, através do teste *t-student*.

O conteúdo de proteínas, açúcares totais, fibras totais e insolúveis da goji convencional foi maior que da goji orgânica. Segundo Siderer, Maquet e Anklam (2005), o maior conteúdo de nutrientes em culturas convencionais pode ser explicado pelo uso de pesticidas, os quais aumentam a disponibilidade e absorção de nitrogênio disponível, essencial para o desenvolvimento nutricional da planta.

Frutas goji orgânicas apresentaram maiores conteúdos de cinzas e lipídeos em relação às convencionais, explicados pela resposta da planta a situações de estresse fisiológico. Plantas orgânicas são mais suscetíveis ao ataque de pragas e patógenos, e frágeis às condições climáticas adversas. Com isso, a planta tende a produzir compostos de defesa, como ácidos graxos com funções antioxidantes e minerais que atuam como cofatores, regulando as vias metabólicas da planta (PEÑUELAS *et al.*, 2008).

**Tabela 01** Composição nutricional, energia e contribuição para a cota dietética recomendada (RDA) da goji berry orgânica e convencional.

Análises <sup>1</sup> (g/100 g)	Goji berry		RDA (mínimo)	%RDA	
	Orgânica	Convencional	g/dia	Orgânica	Convencional
Umidade	15,12 ± 0,10 <sup>a</sup>	15,29 ± 0,18 <sup>a</sup>	-	-	-
Cinzas	5,02 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,01 ± 0,21 <sup>b</sup>	-	-	-
Proteínas	9,57 ± 0,05 <sup>b</sup>	9,72 ± 0,03 <sup>a</sup>	♂ 36 ♀ 46	26,58% 20,80%	27% 21,13%
Lipídeos	4,19 ± 0,55 <sup>a</sup>	2,26 ± 0,41 <sup>b</sup>	-	-	-
Açúcares totais	67,85 ± 0,02 <sup>b</sup>	75,05 ± 1,74 <sup>a</sup>	♂♀ 130	52,19%	57,73%
Fibras totais	9,88 ± 0,25 <sup>b</sup>	11,27 ± 0,22 <sup>a</sup>	♂ 38 ♀ 25	26% 39,52%	29,66% 45,08%
Fibras solúveis	2,08 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,69 ± 0,51 <sup>a</sup>	-	-	-
Fibras insolúveis	7,81 ± 0,14 <sup>b</sup>	8,58 ± 0,35 <sup>a</sup>	-	-	-
Valor calórico (kcal/100 g)	367,06	381,87	-	-	-

<sup>1</sup>Valores expressos como média e desvio padrão ( $n = 3$ ). Diferentes letras em cada linha indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*).

O conteúdo de umidade de ambas as amostras é explicado pelo processo de secagem aplicado. A secagem é largamente utilizada em frutas goji com a finalidade de melhorar a logística de exportação, reduzindo em aproximadamente cinco vezes o teor de umidade inicial (DAHECH *et al.*, 2013; NGUYÊN e SAVAGE, 2013). O teor de umidade determinado para a goji orgânica (15,12%) e convencional (15,29%), na forma seca, foi superior aos encontrados na literatura, 7,50% (USDA, 2016) e 10,34% (ENDES *et al.*, 2015). Estas diferenças podem ser explicadas pelo uso de diferentes técnicas de secagem (natural ou artificial), as quais influenciam no teor de água evaporada (DONNO *et al.*, 2016).

O conteúdo de cinzas para as amostras orgânica (5,02%) e convencional (3,01%) de goji berry seca foram superiores ao conteúdo de cinzas de frutas frescas, 1,06% (DAHECH *et al.*, 2013). A redução da umidade em processos de secagem ocasiona a



concentração de minerais em frutas secas. Nutrientes minerais apresentam importantes funções nas plantas, agem como cofatores em muitas reações enzimáticas, como a biossíntese de aminoácidos e ácidos orgânicos (WATANABE *et al.*, 2015).

As frutas orgânicas e convencionais foram caracterizadas pelo alto teor do macroelemento K (2,20 e 2,12 g/100 g, respectivamente), seguido por Na (370 e 178 mg/100 g), P (183,75 e 212,10 mg/100 g), Ca (149,50 e 126 mg/100 g) e em menor proporção, Mg (67,50 e 73,50 mg/100 g), conforme **Tabela 02**. Microelementos essenciais também foram determinados: Fe (7,42 e 7,07 mg/100 g), Zn (1,96 e 1,75 mg/100 g), Cu (1,54 e 0,98 mg/100 g) e Mn (0,98 e 1,68 mg/100 g). Os teores dos minerais determinados neste estudo foram semelhantes aos relatados por Endes *et al.* (2015) e Llorent-Martínez *et al.* (2013).

**Tabela 02** Composição mineral, metais pesados e contribuição para a cota dietética recomendada (RDA) de amostras de goji berry.

Elementos (mg/100 g)	RDA (mínimo) mg/dia	Goji berry <sup>1</sup>		%RDA	
		Orgânica	Convencional	Orgânica	Convencional
Potássio (K) <sup>2</sup>	-	2,20 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	2,12 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	-	-
Sódio (Na)	-	370,00 ± 5,82 <sup>Ab</sup>	178,00 ± 7,02 <sup>Bc</sup>	-	-
Fósforo (P)	-	183,75 ± 4,45 <sup>Bc</sup>	212,10 ± 7,92 <sup>Ab</sup>	-	-
Cálcio (Ca)	♂♀ 1000	149,50 ± 6,36 <sup>Ad</sup>	126,00 ± 9,90 <sup>Bd</sup>	14,95	12,60
Magnésio (Mg)	♂ 420 ♀ 310	67,50 ± 3,54 <sup>Be</sup>	73,50 ± 4,95 <sup>Ae</sup>	16,07 21,77	17,50 23,71
Ferro (Fe)	♂ 8 ♀ 18	7,42 ± 0,59 <sup>Af</sup>	7,07 ± 0,49 <sup>Bf</sup>	92,75 41,22	88,37 39,28
Zinco (Zn)	♂ 11 ♀ 8	1,96 ± 0,20 <sup>Ag</sup>	1,75 ± 0,30 <sup>Bg</sup>	17,82 24,50	15,91 21,87
Cobre (Cu)	♂♀ 0,9	1,54 ± 0,20 <sup>Ah</sup>	0,98 ± 0,01 <sup>Bh</sup>	171,11	108,89
Manganês (Mn)	♂ 2,3 ♀ 1,8	0,98 ± 0,20 <sup>Bi</sup>	1,68 ± 0,20 <sup>Ag</sup>	44,55 54,44	73,04 93,33
Metais pesados (mg/kg)				Nível máximo <sup>3</sup> (mg/kg)	
Cádmio (Cd)	-	0,01 ± 0,00 <sup>Ab</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>Ab</sup>	0,05	
Mercúrio (Hg)	-	0,07 ± 0,01 <sup>Ba</sup>	0,16 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,10	
Chumbo (Pb)	-	0,01 ± 0,00 <sup>Bb</sup>	0,15 ± 0,01 <sup>Aa</sup>	0,10	

<sup>1</sup>Valores expressos como média e desvio padrão ( $n = 3$ ). <sup>2</sup>g/100 g. <sup>3</sup>Níveis máximos permitidos pela Codex Alimentarius (2015). Diferentes letras maiúsculas em cada linha indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*). Diferentes letras minúsculas em cada coluna indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

A goji berry orgânica apresentou teores dos elementos K, Na, Ca, Fe, Zn e Cu significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) a goji convencional. Estes resultados podem ser explicados pela aplicação de adubos orgânicos, os quais fornecem grande quantidade de nutrientes e microrganismos ao solo. Microrganismos aceleram a mineralização de nutrientes e aumentam a disponibilidade de minerais em plantas (ZHANG, LI e ZHENG, 2017).

A cota dietética recomendada, do inglês *Recommended Dietary Allowances* (RDA) também foi determinada (**Tabela 02**). Segundo a *Food and Nutrition Board* (FNB), alimentos que contêm um conteúdo mineral acima de 15% da RDA podem ser considerados ótimas fontes de nutrientes minerais. Portanto, considerando conteúdos

acima de 15% da RDA, frutas goji orgânicas e convencionais são consideradas ótimas fontes dos nutrientes essenciais Mg, Fe, Zn, Cu e Mn.

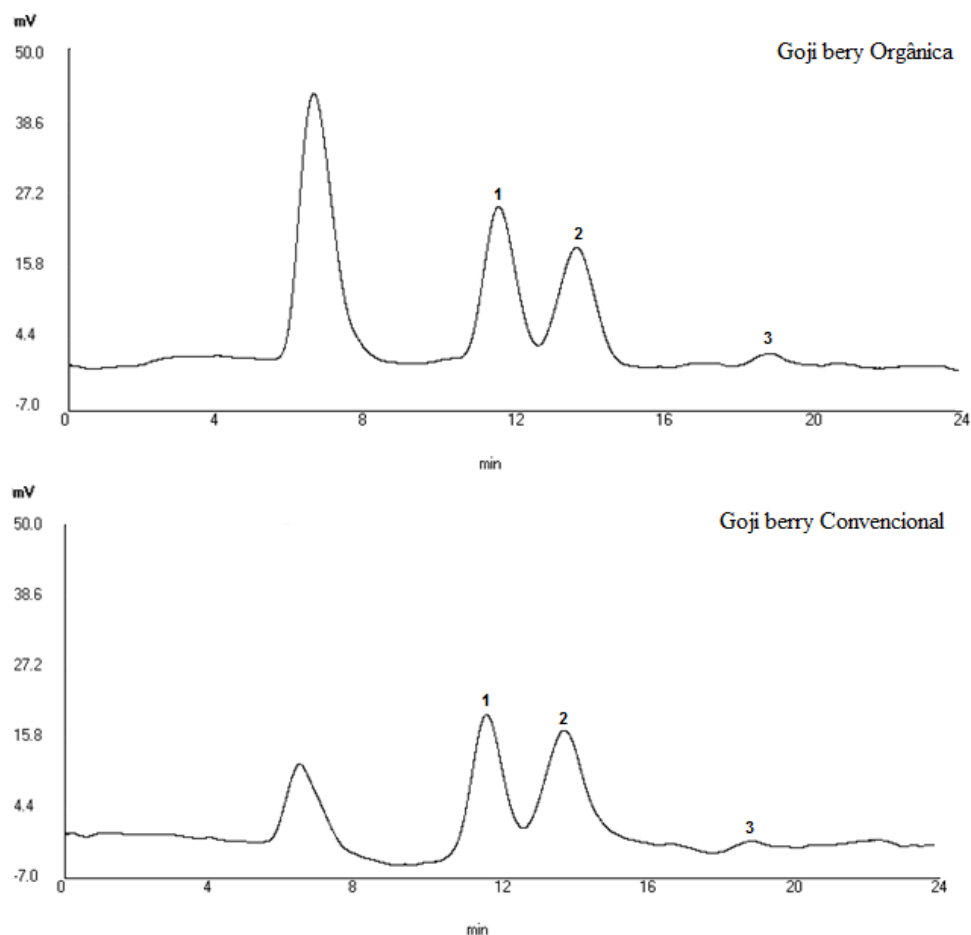
As concentrações de metais pesados nas amostras de goji berry também foram determinadas (**Tabela 02**). A goji berry orgânica apresentou concentrações dos elementos tóxicos Cd, Hg e Pb (0,01, 0,07 e 0,01 mg/kg, respectivamente) dentro dos limites estabelecidos pela Codex Alimentarius (2015). As frutas convencionais apresentaram níveis de Hg e Pb (0,16 e 0,15 mg/kg, respectivamente) acima dos níveis máximos estabelecidos e estão relacionados aos agentes químicos utilizados, os quais apresentam altas concentrações destes compostos tóxicos. Segundo a Codex Alimentarius (2015), o acúmulo destes compostos tóxicos pode ocasionar sérios riscos à saúde humana, como o desenvolvimento de carcinomas.

Teores de proteínas variaram de 9,57 e 9,72% para a fruta orgânica e convencional, respectivamente. Dados da literatura demonstram um conteúdo de proteínas de 8,90 a 14,26% para a goji berry convencional (USDA, 2016; ENDES *et al.*, 2015) e de 10,71% para frutas goji orgânicas. O conteúdo de proteínas em amostras de goji berry corresponde a aproximadamente 26% da RDA para mulheres e 20% para homens. Apesar de conter todos os aminoácidos indispensáveis, frutas goji apresentam baixo conteúdo de proteínas e não são consideradas ótimas fontes de aminoácidos, (DONNO *et al.*, 2016).

O conteúdo de lipídeos de frutas goji, orgânica e convencional variou de 4,19 e 2,26%, respectivamente. O teor de lipídeos do presente estudo pode ser considerado elevado quando comparado com a literatura. Dados da USDA (2016) e Blasi *et al.* (2017) demonstram um teor de 0,39 e 0,48% de lipídeos para goji convencional, respectivamente. Enquanto que o cultivo orgânico da fruta demonstrou um teor de 3,33% (USDA, 2017). As diferenças observadas podem ser atribuídas ao método de cultivo, período de colheita e região de produção (SUÁREZ, RODRÍGUEZ E ROMERO, 2008). Além disso, o método e o solvente utilizados na extração de lipídeos também influenciam no conteúdo total (REZAIE *et al.*, 2015).

Como observado na **Tabela 01** frutas goji apresentam elevado conteúdo de carboidratos. O conteúdo de carboidratos disponíveis (açúcares totais) da goji orgânica (67,85%) e convencional (75,05%) foi semelhante aos relatados por Endes *et al.* (2015), USDA (2016), USDA (2017) e Yang *et al.* (2015). A goji berry orgânica e convencional, pode ser considerada ótima fonte de carboidratos e um importante alimento na dieta, pois fornece mais de 50% de carboidratos recomendados pela RDA.

Carboidratos disponíveis são compostos por açúcares solúveis, como frutose, glicose e sacarose, dos quais foram identificados e quantificados nas amostras de goji berry (Figura 12).



**Figura 12** Perfil cromatográfico dos açúcares solúveis de frutas goji orgânicas e convencionais: Frutose (1), Glicose (2) e Sacarose (3).

A **Tabela 03** demonstra que a frutose é o principal açúcar solúvel em amostras de goji orgânica e convencional (5,45 e 4,92 g/100 g, respectivamente), seguido pela glicose e sacarose, relatados também por Mikulic-Petkovsek *et al.* (2012). O conteúdo total de açúcares solúveis para a goji orgânica e convencional não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ), sendo de 9,92 e 9,75 g/100 g, respectivamente.

**Tabela 03** Conteúdo de açúcares solúveis em frutas goji orgânica e convencional.

Açúcares solúveis <sup>1</sup> (g/100 g)	Goji berry	
	Orgânica	Convencional
Frutose	5,45 ± 0,13 <sup>Aa</sup>	4,92 ± 0,31 <sup>Ba</sup>
Glicose	4,15 ± 0,25 <sup>Bb</sup>	4,46 ± 0,26 <sup>Ab</sup>
Sacarose	0,33 ± 0,06 <sup>Ac</sup>	0,37 ± 0,15 <sup>Ac</sup>
Total açúcares solúveis	9,92 ± 0,43 <sup>A</sup>	9,75 ± 0,71 <sup>A</sup>

<sup>1</sup>Valores expressos como médias e desvio padrão ( $n = 3$ ). Em cada linha, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*). Em cada coluna, diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

A goji berry orgânica e convencional apresentam uma contribuição nutricional importante na dieta (**Tabela 01**), pois 100 g de frutos secos podem fornecer cerca de 28% de fibra dietética recomendada pela RDA para mulheres e 42% para homens (BRASIL, 1998). O teor de fibras totais para as frutas orgânica e convencional (9,88 e 11,27%, respectivamente) estão de acordo com dados da literatura (ENDES et al., 2015; USDA, 2016; USDA, 2017). O conteúdo de fibras insolúveis para as duas amostras de goji berry foi aproximadamente 4 vezes superior às fibras solúveis. Fibras insolúveis, como celulose, hemicelulose e lignina, são importantes na dieta com a finalidade de regular o trânsito intestinal, reduzindo os níveis plasmáticos de glicose e colesterol (TRUMBO *et al.*, 2002).

Parâmetros como acidez titulável total (ATT), pH, sólidos solúveis totais (SST), atividade de água ( $A_w$ ) e cor são extremamente importantes em frutas, pois influenciam nas características sensoriais, como textura, sabor, doçura, acidez e *flavor*. A **Tabela 04** mostra os parâmetros qualitativos analisados em frutas goji. Todos os parâmetros, exceto cor ( $a^*$ ), apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre frutas orgânicas e convencionais. Apesar da diferença significativa, as médias entre a goji berry cultivada no sistema orgânico e convencional foram próximas, evidenciando não haver uma grande diferença entre os sistemas em relação aos parâmetros analisados.

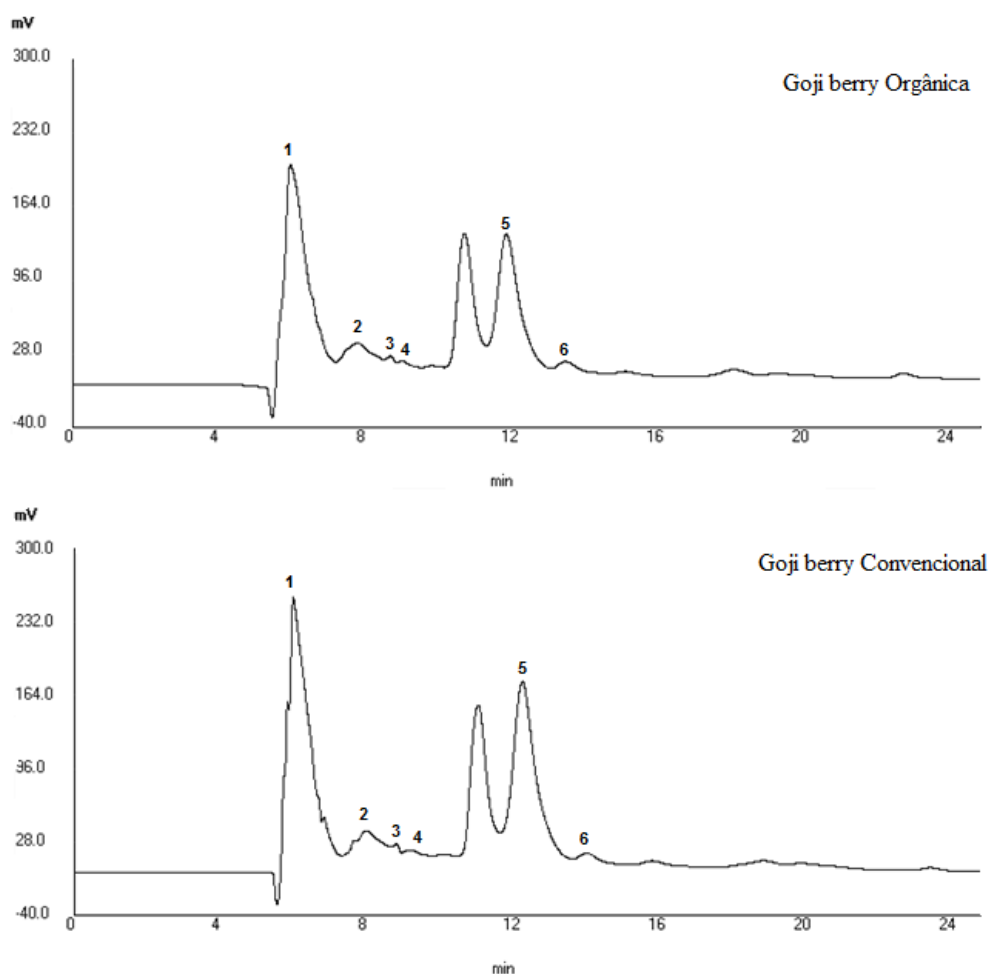
**Tabela 04** Acidez titulável total, pH, sólidos solúveis totais, atividade de água e cor da goji berry orgânica e convencional.

Análises <sup>1</sup>	Goji berry	
	Orgânica	Convencional
ATT <sup>2</sup> (meqNaOH 0,1N/100 g)	3,84 ± 0,22 <sup>b</sup>	4,60 ± 0,20 <sup>a</sup>
pH	5,50 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,31 ± 0,04 <sup>b</sup>
SST <sup>3</sup> (°Brix)	14,50 ± 0,04 <sup>b</sup>	15,00 ± 0,12 <sup>a</sup>
Atividade de água (Aw)	0,34 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,37 ± 0,01 <sup>a</sup>
Cor <sup>4</sup> (L*)	38,79 ± 0,33 <sup>a</sup>	34,83 ± 0,84 <sup>b</sup>
(a*)	32,42 ± 0,61 <sup>a</sup>	31,82 ± 0,40 <sup>a</sup>
(b*)	39,79 ± 0,79 <sup>a</sup>	34,99 ± 0,65 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Valores expressos como média e desvio padrão ( $n = 3$ ). <sup>2</sup>Acidez titulável total. <sup>3</sup>Sólidos solúveis totais.

<sup>4</sup>L\* variação entre branco e preto, a\* variação entre vermelho (+) e verde (-) e b\* variação entre amarelo (+) e azul (-). Em cada linha, diferentes letras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*).

Os parâmetros, ATT, pH e SST influenciam fortemente no sabor de frutas. As amostras de goji orgânica e convencional apresentaram resultados de ATT (3,84 e 4,60 meq NaOH/100 g), pH (5,50 e 5,31) e SST (14,50 e 15 °Brix) próximos aos reportados por Donno *et al.* (2014) e Zhang *et al.* (2016). A ATT em frutas relaciona o teor de ácidos orgânicos com características sensoriais, como adstringência. Além disso, ácidos orgânicos apresentam importante papel na manutenção nutricional de frutas (FERREIRA *et al.*, 2010). Ácidos orgânicos foram identificados e quantificados nas amostras de goji orgânica e convencional, como observado na **Figura 13**.



**Figura 13** Perfil cromatográfico dos ácidos orgânicos de frutas goji orgânicas e convencionais: Oxálico (1), Tartárico (2), Quínico (3), Málico (4), Cítrico (5) e Fumárico (6).

O ácido cítrico foi o principal ácido orgânico presente nas amostras de goji berry orgânicas e convencionais (0,90 e 1,14 g/100 g, respectivamente), seguido pelos ácidos oxálico, tartárico, fumárico e em menor concentração, málico e quínico (**Tabela 05**). O conteúdo de todos os ácidos orgânicos identificados, exceto quínico e fumárico, apresentou diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre frutas orgânicas e convencionais. Diferentes conteúdos de ácidos orgânicos em amostras de goji berry foram determinados na literatura. Os ácidos cítrico e málico foram os principais ácidos orgânicos presentes na goji berry, identificados por Mikulic-Petkovsek *et al.* (2012), enquanto que para Donno *et al.* (2014) o principal ácido orgânico foi o quínico. As variações observadas podem ser explicadas pela forte influência de fatores como, cultivar, estágio de maturação, fertilização, irrigação e composição do solo (FELTRIN, 2002).

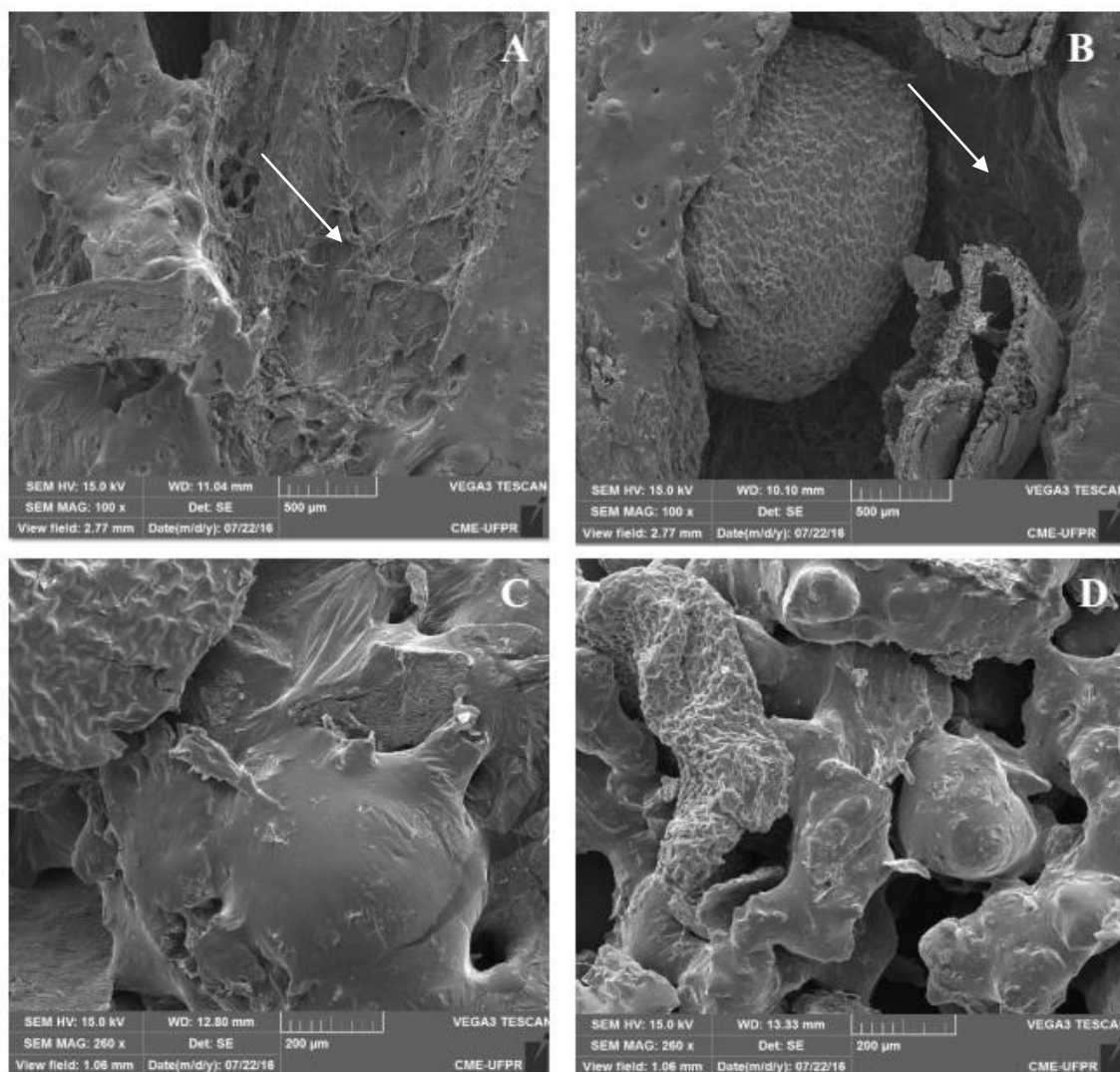
**Tabela 05** Conteúdo de ácidos orgânicos em frutas goji orgânica e convencional.

Ácidos orgânicos <sup>1</sup> (g/100 g)	Goji berry	
	Orgânica	Convencional
Oxálico	0,66 ± 0,01 <sup>Bb</sup>	0,72 ± 0,01 <sup>Ab</sup>
Tartárico	0,21 ± 0,01 <sup>Ac</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>Bc</sup>
Quínico	0,04 ± 0,01 <sup>Af</sup>	0,05 ± 0,00 <sup>Af</sup>
Málico	0,07 ± 0,00 <sup>Be</sup>	0,11 ± 0,01 <sup>Ae</sup>
Cítrico	0,90 ± 0,02 <sup>Ba</sup>	1,14 ± 0,01 <sup>Aa</sup>
Fumárico	0,18 ± 0,01 <sup>Ad</sup>	0,18 ± 0,00 <sup>Ad</sup>

<sup>1</sup>Valores expressos como médias e desvio padrão ( $n = 3$ ). Em cada linha, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*). Em cada coluna, diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

A secagem das amostras de goji berry orgânica e convencional permitiu uma Aw baixa, de 0,34 e 0,37, respectivamente (**Tabela 04**). A **Figura 14 A e B** mostra que frutas goji comercializadas secas apresentam estruturas rugosas com pequenas depressões, características de produtos com baixa Aw. Além disso, após o processo de secagem, frutas ricas em açúcar tendem a ser higroscópicas devido a mudanças estruturais destas moléculas, como o alto grau de amorfismo. Tais mudanças são indesejáveis, principalmente em produtos comercializados em pó, devido à elevada aglomeração das moléculas de açúcar. Micrografias de amostras trituradas de goji berry orgânica e convencional (**Figura 14 C e D**) mostram tal fenômeno de aglomeração, relacionado ao elevado conteúdo de açúcar e potencial higroscópico de frutas goji.

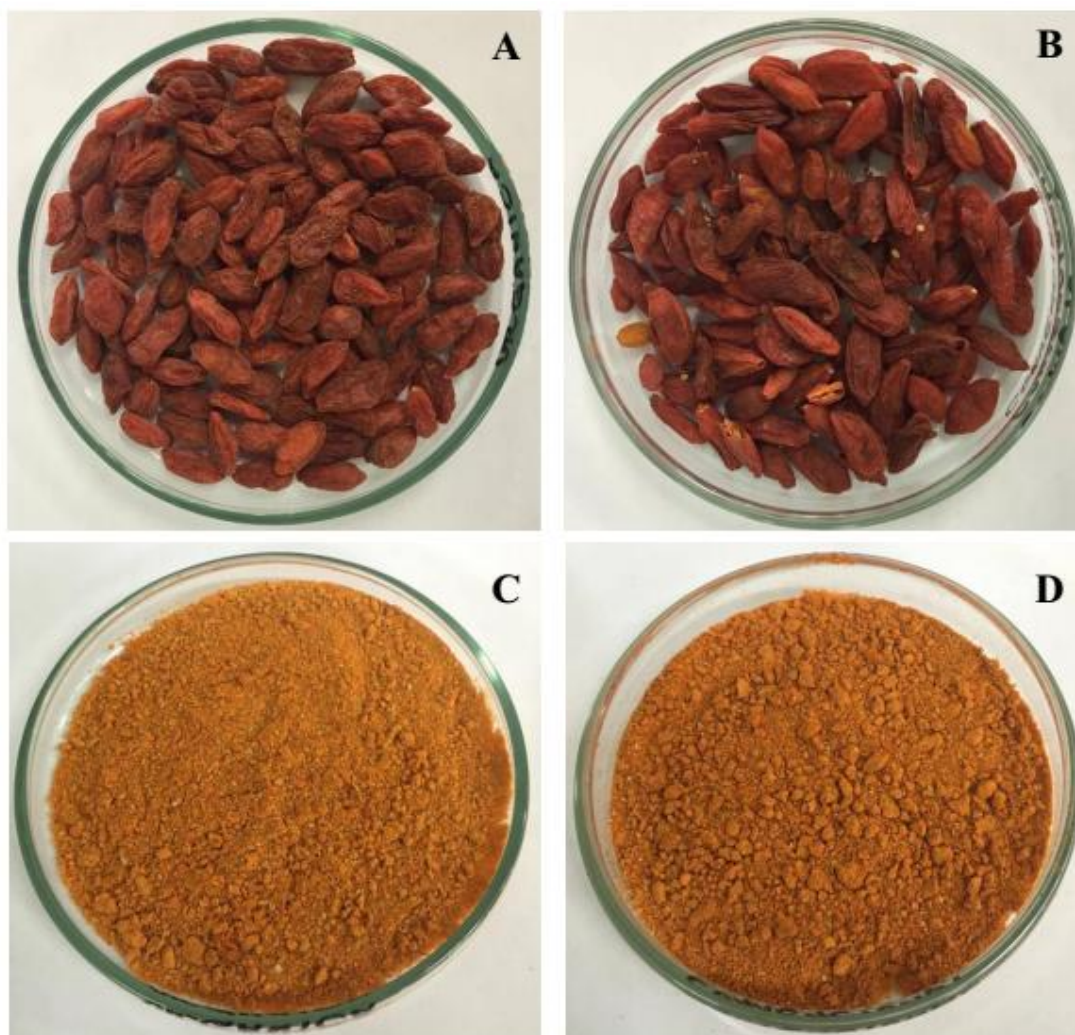




**Figura 14** Microfotografias da goji berry orgânica (A) e (C), e convencional (B) e (D), inteiras e trituradas.

A cor é um atributo importante na indústria de alimentos, pois é um parâmetro de qualidade que influencia a aceitação do produto. A determinação da cor em alimentos é feita pelo sistema  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ . O  $L^*$  indica luminosidade, com variação de 0 (opaco ou “preto”) a 100 (transparente ou “branco”), valores de  $a^*$  positivos indicam tonalidade vermelha ( $-a^*$ , verde), e valores de  $b^*$  positivos indicam tonalidade amarela ( $-b^*$ , azul) (VOSS, 1992). Como mostrado na **Tabela 04**, pode-se dizer que as frutas orgânicas e convencionais apresentaram uma luminosidade opaca ou “preta”, com o  $L^*$  variando de 38,79 e 34,83, respectivamente. Com relação às tonalidades, frutas goji apresentaram coloração laranja-avermelhada, coerentes com as observações visuais das frutas inteiras e trituradas (**Figura 15**). A coloração de frutas goji é atribuída a grande

quantidade de carotenoides, importantes pigmentos responsáveis pela cor amarela, laranja e vermelha de muitas frutas e vegetais (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011).



**Figura 15** Amostras da goji berry orgânica (A) e (C), e convencional (B) e (D), inteiras e trituradas.

## CONCLUSÃO

Uma variabilidade na composição de nutrientes foi observada entre frutas goji cultivadas no sistema orgânico e convencional. No entanto, as duas formas de cultivo podem ser consideradas fontes de nutrientes. Frutas goji cultivadas no sistema convencional apresentaram um maior conteúdo de proteínas, açúcares totais e fibras totais, enquanto que frutas orgânicas tiveram maior teor de cinzas e lipídeos. De acordo com a cota dietética recomendada (RDA), a goji berry é fonte dos nutrientes essenciais Mg, Fe, Cu e Mn, contribuindo positivamente na dieta. A concentração dos elementos tóxicos Cd, Hg e Pb de frutas orgânicas está dentro dos limites estabelecidos pela Codex Alimentarius. Enquanto que frutas convencionais apresentaram níveis de Hg e Pb acima dos níveis máximos estabelecidos. Foram identificados e quantificados três principais açúcares (frutose, glicose e sacarose) nas amostras de goji berry, sendo a frutose o açúcar predominante. Os parâmetros, ATT, pH, SST, Aw e cor foram desejáveis sensorialmente para frutas orgânicas e convencionais. Ácidos orgânicos foram também identificados e quantificados nas amostras, sendo o ácido cítrico predominante, seguido pelos ácidos oxálico, tartárico, fumárico, málico e quínico. Portanto, a goji berry pode ser utilizada na indústria alimentícia como ingrediente, e do ponto de vista de segurança alimentar, a goji berry orgânica apresenta maior potencial de aplicação industrial.

### CAPÍTULO III

---

#### Otimização da extração de compostos bioativos da goji berry orgânica (*Lycium barbarum* L.) e avaliação da estabilidade oxidativa no óleo de soja

##### RESUMO

A capacidade de proteção do extrato da goji berry orgânica contra a oxidação do óleo de soja, como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos, foi investigada. Para isso, a extração de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante foi otimizada. Diferentes solventes foram utilizados no processo de extração. O efeito da temperatura (25-45 °C), tempo (60-180 min) e relação sólido:solvente (1:10-1:30, m/v) no processo de extração foi avaliado através de um planejamento experimental Box-Behnken. Os principais compostos bioativos do extrato otimizado foram identificados e quantificados por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE). O efeito do extrato da fruta orgânica na estabilidade oxidativa do óleo de soja foi avaliado utilizando o teste de Rancimat. A solução de etanol/água (70/30, v/v) foi a mais eficiente na extração de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante. As condições ideais obtidas através do planejamento experimental foram: 45 °C, 162 min e relação sólido:solvente de 1:10, resultando em um extrato com 1338.80 mg/100 g de fenólicos e atividades antioxidantes de 0,73, 3,66 e 2,81 mmolTE/100 g (FRAP, ABTS e DPPH, respectivamente). Os ácidos fenólicos identificados por CLUE foram: siríngico, clorogênico, gálico, cafeico, *p*-cumárico, 4-hidroxibenzoico, ferulico e trans-cinâmico. Os flavonoides foram: rutina, naringina, quercetina, catequina e kaempferol. Os valores do fator de proteção (FP) dos óleos de soja incorporados com extrato da goji berry orgânica (500-3000 mg/kg) foram significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maiores que os óleos com BHT e BHA (100 mg/kg). Esses resultados sugerem que o extrato da goji orgânica pode ser um substituto aos antioxidantes sintéticos na estabilização do óleo de soja contra a deterioração oxidativa.

**Palavras-chave:** metodologia de superfície de resposta, antioxidante natural, superfruta, solvente atóxico.

## 1 INTRODUÇÃO

Frutas de *Lycium barbarum* L., conhecidas como goji berry, *wolfberry* ou "gou-qi-zi", são cultivadas principalmente em países asiáticos (POTTERAT, 2010). Na China, a goji berry é cultivada sob dois sistemas diferentes, orgânico e convencional. A demanda por alimentos orgânicos aumentou em todo o mundo, principalmente devido à conscientização da população sobre possíveis riscos quanto à presença de resíduos químicos nos alimentos (LLORENT-MARTÍNEZ *et al.*, 2013).

As frutas goji são conhecidas como "superfrutas" e têm sido utilizadas por mais de 2500 anos em países asiáticos para fins medicinais (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011). Na literatura diferentes efeitos benéficos foram relatados, como redução do risco de problemas oculares (QIAN, LIU e HUANG, 2004), redução do peso corporal (AMAGASE, 2010), efeitos imunomoduladores (ARROYO-MARTINEZ *et al.*, 2011), bem como atividade antiproliferativa (HOGAN *et al.*, 2010).

As propriedades antioxidantes das goji berries vêm sendo utilizadas para o desenvolvimento de medicamentos, cosméticos e alimentos especiais (PAN *et al.*, 2011), sendo consideradas excelentes fontes de compostos bioativos. Estes compostos biologicamente ativos são adicionados a produtos alimentícios com a finalidade de proporcionar proteção contra processos oxidativos. Muitos estudos demonstram que compostos antioxidantes naturais são tão potentes quanto antioxidantes sintéticos (BHA, BHT e TBHQ) em óleos vegetais (YANG *et al.*, 2016; FRANCO *et al.*, 2016; COMUNIAN *et al.*, 2016). Estes resultados são extremamente importantes, considerando que o consumo prolongado de antioxidantes sintéticos pode causar efeitos cancerígenos e mutagênicos no corpo humano (CORDEIRO *et al.*, 2013).

Portanto, para a obtenção de um extrato vegetal com a finalidade de aplicação, alguns fatores devem ser considerados, como a escolha de um solvente não tóxico, volume e polaridade adequados, influência da temperatura e do tempo, atividade biológica e o rendimento após a extração (PEDRO, GRANATO e ROSSO, 2016).

As indústrias de alimentos aplicam muitas operações tecnológicas para obter extratos vegetais com alto rendimento e baixo custo. A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma abordagem adequada para obter um extrato com características otimizadas (BASSANI, NUNES e GRANATO, 2014). Portanto, para obter um extrato natural com alto teor de antioxidantes, o modelo matemático de MSR pode ser aplicado eficientemente, além de investigar as influências de diferentes fatores na extração (PEDRO, GRANATO e ROSSO, 2016).

Estudos sobre a goji berry orgânica ainda não foram explorados na literatura. Além disso, este é o primeiro estudo que indica a aplicação do extrato de frutas goji orgânicas como antioxidante natural em óleos comestíveis, e não há um estudo da otimização da extração de compostos bioativos com o uso de solventes atóxicos. Portanto, os principais objetivos deste estudo foram: (1) otimizar a extração de compostos fenólicos totais com atividade antioxidante por metodologia de superfície de resposta, (2) identificar e quantificar os compostos bioativos no extrato otimizado por

Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE), e (3) avaliar a capacidade do extrato orgânico em proteger o óleo de soja contra a oxidação pelo método de Rancimat e comparar a eficácia de antioxidantes sintéticos (BHA, BHT e TBHQ).

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 MATERIAIS**

#### **2.1.1 Reagentes**

O reagente de Folin-Ciocalteu, TPTZ, DPPH, ABTS, padrões químicos de grau cromatográfico (pureza  $\geq 95\%$ ), hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e t-butil-hidroquinona (TBHQ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O óleo de soja sem adição de antioxidantes foi fornecido pela Granol Indústria, Comércio e Exportação S/A (São Paulo, SP, Brasil). O metanol, ácido acético, etanol e acetona foram adquiridos da Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A água ultrapura (Milli-Q) foi utilizada em todos os experimentos.

#### **2.1.2 Amostra**

Conforme descrito anteriormente no item 2.1.2 do Capítulo II.

### **2.2 MÉTODOS**

#### **2.2.1 Seleção de solventes**

Diferentes concentrações dos solventes, água ultrapura, acetona, etanol e metanol foram avaliados na extração de compostos bioativos da goji berry orgânica. A seleção do melhor solvente foi determinada em resposta à presença da maior quantidade de fitoquímicos com alta atividade antioxidante nos extratos obtidos (por ensaios FRAP, ABTS e DPPH).

As soluções de etanol/água e metanol/água foram testadas nas proporções de 20/80, 30/70, 50/50 e 70/30 (v/v). Uma solução de acetona a 70% também foi utilizada (LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2005, com modificações). Dois gramas de amostra foram misturados com 20 mL de cada solvente e agitados em um agitador *shaker* (Marconi MA 420, São Paulo, Brasil) a 25 °C, 210 rpm durante 60 min. O sobrenadante foi obtido por centrifugação (MPW-350R, Varsóvia, Polônia) a 4300 rpm por 20 min. O volume foi completado para 50 mL com cada solvente extrator.

A extração sequencial foi realizada de acordo com Larrauri, Rupérez e Saura-Calixto (1997). Dois gramas de amostra foram misturados com 20 mL de metanol/água (50/50, v/v) e agitados em um agitador *shaker* a 25 °C, 210 rpm por 60 min. A mistura foi centrifugada a 4300 rpm durante 20 min e recuperou-se o sobrenadante. O sedimento foi adicionado de 20 mL de solução de acetona/água (70/30, v/v) e as etapas de agitação e centrifugação foram repetidas. Os extratos foram combinados e o volume foi completado para 50 mL com água ultrapura.

A extração sequencial utilizando acetona/água/ácido acético (70/28/2, v/v/v) foi realizada de acordo com Kevers *et al.* (2007) e as condições de extração usadas por Liyana-Pathirana e Shahidi (2005) (citadas acima) foram empregadas.

Todos os extratos foram armazenados em frascos de vidro âmbar a -20 °C para análises posteriores.

### 2.2.2 Planejamento experimental

Um planejamento experimental Box-Behnken (**Tabela 06**) foi utilizado para avaliar o efeito de três variáveis independentes na extração dos compostos bioativos e atividade antioxidante *in vitro* de frutas goji orgânicas: temperatura ( $x_1$ , 25-45 °C), tempo ( $x_2$ , 60-180 min) e relação sólido:líquido ( $x_3$ , 1:10-1:30 g:mL). Os parâmetros de resposta foram: compostos fenólicos totais, flavonoides totais, antocianinas totais, carotenoides totais e atividade antioxidante (FRAP, ABTS e DPPH). O *design* completo consistiu de 17 combinações, incluindo 5 repetições do ponto central, a fim de estimar o erro puro e avaliar a falta de ajuste dos modelos propostos. Os experimentos foram realizados de forma aleatória e em triplicata.

**Tabela 06** Planejamento Box-Behnken para a extração de compostos bioativos da goji berry orgânica.

Ensaio	Variáveis reais e codificadas		
	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Sólido:solvente (1:mL, m/v)
1	25(-1)	120(0)	30(+1)
2	25(-1)	60(-1)	20(0)
3	25(-1)	180(+1)	20(0)
4	25(-1)	120(0)	10(-1)
5	35(0)	180(+1)	10(-1)
6	35(0)	60(-1)	10(-1)
7	35(0)	180(+1)	30(+1)
8	35(0)	60(-1)	30(+1)
9	45(+1)	120(0)	10(-1)
10	45(+1)	120(0)	30(+1)
11	45(+1)	180(+1)	20(0)
12	45(+1)	60(-1)	20(0)
13 (C)	35(0)	120(0)	20(0)
14 (C)	35(0)	120(0)	20(0)
15 (C)	35(0)	120(0)	20(0)
16 (C)	35(0)	120(0)	20(0)
17 (C)	35(0)	120(0)	20(0)

(C) = Ponto central.

### 2.2.3 Compostos fenólicos totais (CFT)

O CFT foi determinado utilizando o método Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965). Em tubos de ensaio de 1 mL foram adicionados 600 µL de água ultrapura, 200 µL de extrato diluído (1/20, v/v) e 50 µL do reativo Folin-Ciocalteu. Posteriormente, foram adicionados 150 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15%, m/v) a cada tubo seguido de agitação. Após 60 min de reação, a absorbância foi determinada em um espectrofotômetro de microplacas a 760 nm (Epoch, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). Uma curva de calibração ( $y = 0,0101x + 0,0355$ ;  $R^2 = 0,9987$ ) foi preparada usando ácido gálico como padrão e os resultados de CFT foram expressos como mg equivalentes de ácido gálico por 100 g de amostra seca (mgEAG/100 g).

### 2.2.4 Flavonoides totais (FT)

O conteúdo de FT foi quantificado usando o ensaio colorimétrico de cloreto de alumínio (JIA, TANG e WU, 1999). Em tubos de ensaio de 1 mL foram adicionados 100 µL de amostra, 400 µL de água ultrapura e 30 µL de NaNO<sub>2</sub> (5%, m/v). Após 5



min, adicionou-se 60  $\mu\text{L}$  de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (10%, m/v) e deixou reagir durante 6 min. Em seguida, foram adicionados e misturados 200  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{NaOH}$  1 mol/L e 210  $\mu\text{L}$  de água ultrapura. Após 5 min de reação, a absorbância foi medida a 510 nm (Epoch, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). A curva de calibração ( $y = 0,0011x + 0,0250$ ;  $R^2 = 0,9954$ ) foi preparada com o padrão catequina e os resultados foram expressos como mg equivalentes de catequina por 100 g de frutos secos (mgEC/100 g).

### 2.2.5 Antocianinas totais (AT)

Antocianinas totais (AT) foram quantificadas pelo método do pH-diferencial (GIUSTI e WROLSTAD, 2001). O extrato foi diluído em uma solução de pH 1,0 ( $\text{HCl}$  0,1 mol/L,  $\text{KCl}$  25 mmol/L) e em uma solução de pH 4,5 (0,4 mol/L  $\text{CH}_3\text{COONa}$ ). A absorbância das misturas foi medida a 515 e 700 nm em um espectrofotômetro UV-Visível (BEL Photonics 2000 UV, São Paulo, SP, Brasil). O valor de  $(\text{Abs}_{515} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 1,0} - (\text{Abs}_{515} - \text{Abs}_{700})_{\text{pH } 4,5}$  corresponde à absorbância das antocianinas. O cálculo do AT foi baseado em um coeficiente de extinção molar de cianidina-3-glucosídeo de 26900 e uma massa molecular de 449,20 g/mol. Os resultados foram expressos como mg equivalentes de cianidina-3-glucosídeo por 100 g de amostra seca.

### 2.2.6 Carotenoides totais (CT)

O teor de CT foi determinado utilizando o ensaio colorimétrico de Rodriguez-Amaya e Kimura (2004), com modificações. Em um balão volumétrico de 5 mL foram adicionados 2 mL dos extratos e o volume foi completado com etanol a 70%. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV-Visível (BEL Photonics 2000 UV, São Paulo, SP, Brasil) a 445 nm. O cálculo de CT baseou-se na zeaxantina, com coeficiente de extinção molar de 2592 (em etanol 70%), e os resultados foram expressos como mg de zeaxantina por 100 g de amostra seca.

### 2.2.7 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos fenólicos foi determinada através de três ensaios *in vitro* [(*ferric reducing antioxidant power* (FRAP), *ABTS radical cation decolonization* (ABTS) e *DPPH radical scavenging ability* (DPPH)]. As curvas de calibração para todos os ensaios foram preparadas com padrão Trolox e os resultados expressos em milimol equivalentes de Trolox por 100 g de fruta seca (mmolTE/100 g).

O ensaio de FRAP foi determinado de acordo com o método de Benzie e Strain (1996). O reagente FRAP foi preparado por uma mistura de tampão acetato (300 mmol/L, pH 3,6), 10 mmol/L de TPTZ (diluído em 40 mmol/L HCl) e 20 mmol/L de  $\text{FeCl}_3$  (10/1/1, v/v/v). Em tubos de ensaio de 1 mL foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de tampão acetato pH 3,6, 200  $\mu\text{L}$  do reagente FRAP e 100  $\mu\text{L}$  das amostras diluídas (1/20, v/v). Os tubos foram agitados e incubados durante 40 min a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , e então a absorbância foi determinada a 596 nm (Epoch, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA) correlacionada com uma curva de calibração de Trolox ( $y = 0,0015x + 0,1321$ ;  $R^2 = 0,9904$ ).

A determinação da atividade antioxidante pelo ensaio de ABTS foi realizada conforme Re *et al.* (1999). A solução de trabalho foi preparada: 5 ml de ABTS 7 mmol/L e 88  $\mu\text{L}$  de persulfato de potássio 140 mmol/L e deixou-se reagir durante 16 h à temperatura ambiente ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) no escuro. Aproximadamente 1 mL do radical ABTS foi diluído com 50 mL de etanol para obter uma absorbância de 1,10 a 734 nm. Em tubos de ensaio de 1 mL foram adicionados 990  $\mu\text{L}$  da solução ABTS e 10  $\mu\text{L}$  dos extratos diluídos (1/8, v/v), e armazenados no escuro durante 2 h. A absorbância foi determinada a 734 nm (Epoch, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA) e correlacionada com uma curva padrão de Trolox ( $y = -0,00009x + 0,5821$ ;  $R^2 = 0,9916$ ).

A capacidade de sequestro do radical DPPH $^\bullet$  foi determinada de acordo com Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Em tubos de 1 mL foram adicionados 550  $\mu\text{L}$  de etanol e 350  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH em etanol a 223  $\mu\text{mol/L}$ . A mistura foi armazenada no escuro durante 30 min e a absorbância determinada a 517 nm (Epoch, Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). As absorbâncias foram correlacionadas com uma curva padrão de Trolox ( $y = -0,0009x + 0,7677$ ;  $R^2 = 0,9799$ ).

### 2.2.8 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE)

A identificação e a quantificação de compostos fenólicos do extrato obtido nas condições otimizadas foram realizadas em um cromatógrafo Acquity UPLC H-Class (Waters, Miliford, MA, EUA), coluna Acquity BEH  $\text{C}_{18}$  (Waters, Miliford, MA, EUA) (2,1 x 50 mm, 1,7  $\mu\text{m}$ ). O extrato foi filtrado através de um filtro de seringa de *nylon* de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, São Paulo, SP, Brasil) e 2  $\mu\text{L}$  foram injetados a  $20^\circ\text{C}$ . A fase móvel foi constituída pelo solvente A (água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico, v/v) e solvente B (metanol com 0,1% de ácido fórmico, v/v), com vazão de 0,5 mL/min.

Condições de gradiente: 0 min - 0% B; 8 min - 20% B; 15 min - 100% B; 18 min - 0% B e eluição isocrática com 0% B em 20 min. As quantificações foram realizadas utilizando curvas de calibração dos padrões de ácido gálico, ácido 3,4-dihidroximetil, ácido 4-hidroximetil, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, ácido trans-cinâmico, catequina, rutina, naringina, quercetina e kaempferol, monitorados a 260, 270, 280 e 370 nm.

### 2.2.9 Teste de Rancimat

O extrato fenólico de frutas orgânicas, obtido através das condições otimizadas, foi seco a 37 °C sob pressão reduzida em um evaporador rotativo (Fisatom 802, São Paulo, SP, Brasil). Diferentes concentrações (500, 1000, 1500, 2000, 2500 e 3000 mg/kg) do extrato foi adicionado ao óleo de soja refinado (sem adição de antioxidantes) fornecido pela empresa Granol Ind. Com. e Exp. S/A. O resultado foi comparado com amostras de óleo de soja com adição dos antioxidantes sintéticos BHT, BHA e TBHQ na concentração de 100 mg/kg. As amostras foram analisadas quanto a estabilidade oxidativa, de acordo com o método proposto por Abbeddou *et al.* (2013). O teste foi realizado em um equipamento Rancimat (Metrohm 873, Suíça), no Laboratório de análises de combustíveis (Lacaut) da Universidade Federal do Paraná (UFPR), nas seguintes condições: 3 g de óleo, fluxo de ar de 20 L/h a 100 °C. Uma amostra controle (sem adição de antioxidantes) também foi oxidada nas mesmas condições. A medida do teste de Rancimat é baseada na determinação da condutividade elétrica dos produtos voláteis da degradação.

### 2.2.10 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e o planejamento experimental foi avaliado usando o teste de normalidade Anderson-Darling. A homogeneidade das variâncias foi realizada pelo teste Brown-Forsythe (Action Software versão 2.5, Estatcamp, Campinas, Brasil). A análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar diferenças significativas entre os tratamentos. O teste de Fisher LSD foi utilizado para comparar os tratamentos com diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). Quando o valor de probabilidade (valor de  $p$ ) foi inferior a 0,05, a variável de resposta foi submetida à análise de regressão linear múltipla usando a metodologia de superfície de resposta (MSR). A função de resposta ( $Y_n$ ) foi particionada

em componentes lineares, quadráticos e interativos. Os dados foram modelados usando a equação abaixo:

$$Y_n(x) = \sum_{i=1}^3 b_i x_i + \sum_{i \leq j}^3 \sum_j^3 b_{ij} x_i x_j + b_{ijk} x_i x_j x_k$$

Onde  $Y_n$  é a resposta prevista,  $b_i$ ,  $b_{ij}$  e  $b_{ijk}$  são os coeficientes de regressão para os termos linear, quadrático e cúbico, respectivamente, e  $x_i$ ,  $x_j$  e  $x_k$  são as variáveis independentes e 3 é o número de fatores. A falta de ajuste ( $p$ -lack of fit), a porcentagem da variância total explicada ( $r^2$  e  $r^2$  ajustado ( $r^2_{aj}$ )) e a significância estatística do modelo ( $p$ -valor) foram utilizadas para verificar a adequação do modelo. Para maximizar a extração de fenólicos totais, flavonoides, antocianinas, carotenoides e atividade antioxidante (FRAP, ABTS e DPPH) do extrato de goji, os modelos de regressão foram submetidos a uma abordagem de otimização de respostas múltiplas (DERRINGER e SUICH, 1980). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Experimentos preliminares (seleção de solventes)

O tipo de solvente influencia fortemente a eficiência da extração de compostos antioxidantes de matrizes vegetais (REZAIE *et al.*, 2015). No presente estudo, uma ampla variedade de solventes com diferentes propriedades físico-químicas foram utilizados para extrair compostos fitoquímicos da goji berry orgânica. Os solventes utilizados mostraram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) no conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT), antocianinas totais (AT), carotenoides totais (CT) e atividade antioxidante, como mostrado na **Tabela 07**.

**Tabela 07** Conteúdo de compostos bioativos extraídos da goji berry orgânica com diferentes solventes.

Solventes	Fenólicos (CFT) (mgEAG/100 g)	Flavonoides (FT) (mgEC/100 g)	Antocianinas (AT) (mg/100 g)	Carotenoides (CT) (mg/100 g)	Atividade antioxidante		
					FRAP <sup>1</sup> (mmolTE/100 g)	ABTS <sup>1</sup> (mmolTE/100 g)	DPPH <sup>1</sup> (mmolTE/100 g)
Metanol							
20% (MeOH20)	1052,53 ± 42,89 <sup>fgh</sup>	64,25 ± 1,25 <sup>cd</sup>	0,83 ± 0,02 <sup>ef</sup>	59,97 ± 2,47 <sup>a</sup>	0,65 ± 0,10 <sup>efg</sup>	6,26 ± 0,05 <sup>e</sup>	1,51 ± 0,07 <sup>c</sup>
30% (MeOH30)	1084,42 ± 3,40 <sup>ef</sup>	38,18 ± 4,90 <sup>gh</sup>	1,62 ± 0,44 <sup>d</sup>	37,28 ± 4,75 <sup>fg</sup>	0,66 ± 0,05 <sup>efg</sup>	5,51 ± 0,03 <sup>f</sup>	0,94 ± 0,01 <sup>e</sup>
50% (MeOH50)	1002,37 ± 20,07 <sup>h</sup>	54,27 ± 0,00 <sup>ef</sup>	1,07 ± 0,12 <sup>ef</sup>	33,47 ± 1,63 <sup>hi</sup>	0,28 ± 0,07 <sup>gh</sup>	6,31 ± 0,09 <sup>e</sup>	1,62 ± 0,05 <sup>b</sup>
70% (MeOH70)	1736,36 ± 3,99 <sup>a</sup>	100,10 ± 6,91 <sup>b</sup>	1,64 ± 0,68 <sup>d</sup>	35,00 ± 2,02 <sup>gh</sup>	2,33 ± 0,38 <sup>a</sup>	5,44 ± 0,19 <sup>f</sup>	1,51 ± 0,04 <sup>c</sup>
Etanol							
20% (EtOH20)	1078,73 ± 30,46 <sup>f</sup>	32,54 ± 4,34 <sup>hi</sup>	1,32 ± 0,12 <sup>d</sup>	31,20 ± 0,90 <sup>i</sup>	1,04 ± 0,09 <sup>ef</sup>	4,71 ± 0,47 <sup>g</sup>	1,08 ± 0,10 <sup>g</sup>
30% (EtOH30)	1025,15 ± 17,54 <sup>gh</sup>	45,34 ± 6,31 <sup>fg</sup>	0,66 ± 0,00 <sup>ef</sup>	49,17 ± 2,31 <sup>c</sup>	1,03 ± 0,00 <sup>de</sup>	6,19 ± 0,42 <sup>e</sup>	1,28 ± 0,08 <sup>d</sup>
50% (EtOH50)	1312,33 ± 12,26 <sup>c</sup>	64,70 ± 6,12 <sup>cd</sup>	3,32 ± 0,25 <sup>c</sup>	43,00 ± 2,60 <sup>de</sup>	0,14 ± 0,09 <sup>h</sup>	6,35 ± 0,50 <sup>e</sup>	1,15 ± 0,02 <sup>f</sup>
70% (EtOH70)	1351,45 ± 25,06 <sup>b</sup>	95,90 ± 15,70 <sup>b</sup>	18,29 ± 0,28 <sup>a</sup>	49,10 ± 2,00 <sup>c</sup>	1,25 ± 0,07 <sup>cd</sup>	6,88 ± 0,29 <sup>cd</sup>	1,64 ± 0,03 <sup>b</sup>
Acetona 70% (A70)	1219,96 ± 27,24 <sup>d</sup>	74,19 ± 9,75 <sup>d</sup>	0,06 ± 0,01 <sup>e</sup>	54,70 ± 1,85 <sup>b</sup>	0,74 ± 0,16 <sup>ef</sup>	6,99 ± 0,45 <sup>c</sup>	1,64 ± 0,03 <sup>b</sup>
Metanol/Acetona (MA)	1067,11 ± 19,45 <sup>fg</sup>	20,85 ± 5,01 <sup>i</sup>	3,99 ± 0,39 <sup>c</sup>	33,50 ± 0,79 <sup>hi</sup>	0,58 ± 0,13 <sup>fg</sup>	7,40 ± 0,39 <sup>b</sup>	1,61 ± 0,05 <sup>b</sup>
Acetona/ácido acético/água (AAA)	1135,40 ± 40,17 <sup>e</sup>	437,58 ± 11,96 <sup>a</sup>	6,99 ± 0,55 <sup>b</sup>	43,77 ± 1,70 <sup>d</sup>	1,47 ± 0,26 <sup>bc</sup>	7,98 ± 0,28 <sup>a</sup>	2,33 ± 0,09 <sup>a</sup>
Água (A)	822,45 ± 60,45 <sup>i</sup>	57,27 ± 8,45 <sup>ef</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>e</sup>	39,57 ± 0,64 <sup>ef</sup>	0,66 ± 0,13 <sup>efg</sup>	6,35 ± 0,24 <sup>c</sup>	1,26 ± 0,04 <sup>d</sup>
<i>p</i> (Normalidade) <sup>2</sup>	0,20	0,89	0,12	0,42	0,51	0,63	0,14
<i>p</i> (Levene) <sup>3</sup>	0,85	0,56	0,13	0,98	0,60	0,31	0,36
<i>p</i> (ANOVA) <sup>4</sup>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

<sup>1</sup>Atividade antioxidante pelos métodos de FRAP, ABTS e DPPH. <sup>2</sup>Valores obtidos pelo teste de normalidade (Anderson-Darling). <sup>3</sup>Valores obtidos pelo teste de homogeneidade de variâncias (Levene). <sup>4</sup>Valores obtidos pela análise de variância (ANOVA).

Diferentes letras na mesma coluna representam resultados com diferença estatística, conforme teste Fisher LSD ( $p \leq 0,05$ ).

O conteúdo de CFT variou estatisticamente ( $p < 0,001$ ) de 822,45 (A) a 1736,36 mgEAG/100 g (MeOH70). Como mostrado na **Tabela 07**, o conteúdo de CFT dos extratos foi na ordem de MeOH70 > EtOH70 > EtOH50 > A70 > AAA > MeOH30 > EtOH20 > MA > MeOH20 > EtOH30 > MeOH50 > A. Solventes diluídos em água numa proporção acima de 1:1 foram mais eficazes na extração de compostos fenólicos da goji berry orgânica. A mistura de solventes e água é mais eficiente que o sistema monossolvente, uma vez que os compostos fenólicos glicosilados são mais solúveis em água. O alto conteúdo de CFT determinado em extratos alcoólicos pode ser explicado pelas diferentes reações químicas envolvidas. O metanol e o etanol, além de apresentarem um comportamento seletivo na extração de compostos glicosilados, também podem extrair compostos não glicosilados devido à alta disponibilidade do par de elétrons livres. Os alcoóis participam de reações químicas carbono-oxigênio e oxigênio-ligação de hidrogênio, enquanto que a água está envolvida apenas nas ligações oxigênio-hidrogênio (PHILIP e CHRISTINA, 2000).

Entre os solventes analisados, o MeOH70 e o EtOH70 produziram extratos com maior conteúdo fenólico, 1736,36 e 1351,45 mg/100 g, respectivamente (**Tabela 07**). Medina (2011) publicou resultados semelhantes na extração de compostos fenólicos de frutas goji secas, onde o conteúdo variou de 895 a 1036 mg/100 g. Ionica, Nour e Trandafir (2012) mostraram grande diferença no conteúdo de compostos fenólicos entre frutas goji secas e frescas, 342,59 e 174,27 mg/100 g. Os diferentes teores de compostos fenólicos encontrados na literatura podem ser atribuídos aos processos pós-colheita, como a secagem. A secagem convencional (exposição ao sol) altera a composição química da planta, liberando compostos fenólicos insolúveis (flavonoides) e aumentando o conteúdo fenólico total (NUNES *et al.*, 2016). Além disso, o conteúdo de fenólicos em frutas depende de fatores como, estágio de maturação e sistemas de cultivo utilizados (orgânico ou convencional) (PERTUZATTI *et al.*, 2015).

O conteúdo de FT variou estatisticamente ( $p < 0,001$ ) entre 20,85 (MA) e 437,58 mgEC/100 g (AAA). Os flavonoides são compostos que podem ser complexados com outros compostos, como açúcares. O alto teor de flavonoides extraído com a solução de acetona acidificada pode ser explicado pelo fato de que os solventes acidificados proporcionam a ruptura da membrana do material celular, descomplexação e protonação das moléculas, liberando componentes solúveis (NACZK e SHAHIDI, 2006). Os extratos obtidos com os solventes alcoólicos, MeOH70 e EtOH70, apresentaram alto conteúdo de flavonoides, 100,10 e 95,90 mg/100 g, respectivamente. Os resultados do

presente estudo foram semelhantes aos relatados na literatura. O conteúdo de flavonoides em frutas goji secas determinados por Qian, Liu e Hung (2004) foram de 115,40, 120,70 e 149,70 mg/100 g nos extratos, aquoso, 50 e 70% de etanol, respectivamente. No estudo realizado por Wang *et al.* (2010), o teor de flavonoides totais do extrato etanólico de frutas goji foi de 119,30 mg/100 g.

O teor de AT variou estatisticamente ( $p < 0,001$ ) de 0,02 (A) para 18,29 mg/100 g (EtOH70). As antocianinas são moléculas polares, devido aos grupos substituintes (hidroxil, carboxil e metoxil) e glicosilas residuais ligadas a anéis aromáticos. Devido ao fato de que as antocianinas são glicosiladas, os solventes polares (EtOH70) tendem a ter maior afinidade por essas moléculas. Na literatura, poucos estudos relacionados a antocianinas de frutas goji foram relatados. Abdennacer *et al.* (2015) relataram um baixo teor de antocianinas totais em frutas (7,90 mg/100 g) e folhas (2,50 mg/100 g) de *Lycium intractum* boiss. O teor de antocianinas em frutas goji é considerado baixo comparado a *blackberry* e *blueberry*, 5861,05 e 2972,28 mg/100 g, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2014). Carotenoides são os principais compostos responsáveis pela coloração da goji berry, enquanto que as antocianinas são os pigmentos predominantes em frutas vermelhas, como *blackberry* e *blueberry*.

Conteúdos de CT variaram estatisticamente ( $p < 0,001$ ) entre 31,20 (EtOH20) e 59,97 mg/100 g (MeOH20). Os carotenoides são compostos lipossolúveis com coloração variando de amarelo a vermelho e estão presentes em grande quantidade em frutos *Lycium barbarum* (WANG *et al.*, 2010). A zeaxantina dipalmitato é o carotenoide predominante (31-56%) em frutos *Lycium* (PENG *et al.*, 2005). Inbaraj *et al.* (2008) determinaram elevada concentração de zeaxantina dipalmitato (114,37 mg/100 g) em frutas frescas de *Lycium barbarum* L. Quando comparado com a literatura, a goji berry do presente estudo mostrou baixo conteúdo de carotenoides. Os resultados de Weng-Ping *et al.* (2008) mostraram que o conteúdo de zeaxantina dipalmitato pode diminuir de 2 a 22 vezes durante o processo de secagem e armazenamento. Além disso, por razões de afinidade (solvente-soluto), solventes apolares como hexano e éter de petróleo seriam os mais adequados para extrair um maior conteúdo de carotenoides (apolar) da goji berry (REZAIE *et al.*, 2015).

Com base nos resultados obtidos (**Tabela 07**), o EtOH70 foi considerado um solvente eficiente para a extração de compostos bioativos com alta atividade antioxidante da goji berry orgânica. Os procedimentos de extração que utilizam etanol são desejáveis do ponto de vista da saúde pública e industrial. Este solvente é

considerado seguro para processamento de alimentos porque não são tóxicos como o metanol (PEDRO, GRANATO e ROSSO, 2016). Por esta razão, o EtOH70 foi escolhido para a extração de compostos bioativos de frutas goji no planejamento experimental.

### **3.2 Metodologia de superfície de resposta (MSR)**

A **Tabela 08** mostra os dados experimentais de todas as variáveis de resposta: fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT), antocianinas totais (AT), carotenoides totais (CT) e atividade antioxidante pelos métodos de FRAP, ABTS e DPPH. Observou-se homogeneidade de variâncias (Levene,  $p \geq 0,05$ ) e diferenças significativas (ANOVA,  $p < 0,001$ ) entre os resultados.



**Tabela 08** Planejamento Box-Behnken com dados experimentais dos compostos bioativos extraídos da goji berry orgânica.

Ensaio	Variáveis de reposta <sup>1</sup>						
	Fenólicos (CFT)	Flavonoides (FT)	Antocianinas (TA)	Carotenoides (TC)	FRAP <sup>2</sup>	ABTS <sup>2</sup>	DPPH <sup>2</sup>
	(mgEAG/100 g)	(mgEC/100 g)	(mg/100 g)	(mg/100 g)	(mmolTE/100 g)	(mmolTE/100 g)	(mmolTE/100 g)
1	1263,72 ± 3,66 <sup>de</sup>	108,94 ± 27,19 <sup>fgh</sup>	11,90 ± 2,16 <sup>de</sup>	65,20 ± 2,80 <sup>ab</sup>	1,10 ± 0,15 <sup>b</sup>	2,89 ± 0,08 <sup>c</sup>	2,56 ± 0,35 <sup>b</sup>
2	1147,72 ± 41,56 <sup>kl</sup>	136,66 ± 15,65 <sup>cde</sup>	6,55 ± 2,05 <sup>h</sup>	61,70 ± 2,10 <sup>bcd</sup>	0,37 ± 0,05 <sup>fg</sup>	2,34 ± 0,16 <sup>de</sup>	2,60 ± 0,12 <sup>b</sup>
3	1168,06 ± 3,56 <sup>jkl</sup>	112,49 ± 19,09 <sup>fgh</sup>	4,72 ± 0,88 <sup>h</sup>	64,10 ± 0,90 <sup>abc</sup>	0,65 ± 0,07 <sup>cd</sup>	0,42 ± 0,04 <sup>i</sup>	2,33 ± 0,02 <sup>cd</sup>
4	1207,80 ± 22,95 <sup>ghi</sup>	132,69 ± 13,06 <sup>cdef</sup>	15,92 ± 1,14 <sup>b</sup>	49,20 ± 5,10 <sup>fg</sup>	0,55 ± 0,09 <sup>de</sup>	1,45 ± 0,16 <sup>hi</sup>	2,09 ± 0,04 <sup>ef</sup>
5	1136,63 ± 7,30 <sup>l</sup>	112,99 ± 3,02 <sup>efgh</sup>	21,02 ± 0,99 <sup>a</sup>	53,60 ± 4,90 <sup>ef</sup>	0,24 ± 0,14 <sup>hijk</sup>	2,23 ± 0,08 <sup>e</sup>	2,39 ± 0,29 <sup>bcd</sup>
6	1250,95 ± 24,47 <sup>def</sup>	102,82 ± 2,62 <sup>h</sup>	10,97 ± 1,97 <sup>efg</sup>	58,10 ± 3,50 <sup>de</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>ghi</sup>	2,23 ± 0,11 <sup>e</sup>	2,46 ± 0,19 <sup>bc</sup>
7	1194,56 ± 13,21 <sup>hij</sup>	122,28 ± 0,00 <sup>defgh</sup>	6,58 ± 1,55 <sup>h</sup>	53,40 ± 5,10 <sup>efg</sup>	0,26 ± 0,04 <sup>hij</sup>	1,31 ± 0,12 <sup>i</sup>	2,23 ± 0,06 <sup>cde</sup>
8	1218,83 ± 24,62 <sup>fgh</sup>	137,62 ± 20,57 <sup>cd</sup>	9,47 ± 1,71 <sup>fg</sup>	62,90 ± 3,00 <sup>bcd</sup>	1,21 ± 0,01 <sup>a</sup>	2,31 ± 0,12 <sup>de</sup>	2,62 ± 0,07 <sup>b</sup>
9	1376,74 ± 3,62 <sup>ab</sup>	164,47 ± 3,02 <sup>ab</sup>	5,62 ± 2,46 <sup>h</sup>	67,90 ± 1,40 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,09 <sup>de</sup>	3,00 ± 0,55 <sup>bc</sup>	2,85 ± 0,18 <sup>a</sup>
10	1401,43 ± 22,65 <sup>a</sup>	162,66 ± 15,77 <sup>ab</sup>	9,30 ± 1,63 <sup>g</sup>	48,60 ± 0,90 <sup>g</sup>	0,57 ± 0,10 <sup>de</sup>	4,64 ± 0,35 <sup>a</sup>	2,66 ± 0,22 <sup>b</sup>
11	1340,17 ± 14,12 <sup>bc</sup>	183,32 ± 11,78 <sup>a</sup>	11,69 ± 0,22 <sup>def</sup>	48,60 ± 2,80 <sup>g</sup>	0,69 ± 0,16 <sup>c</sup>	3,25 ± 0,27 <sup>b</sup>	2,46 ± 0,39 <sup>cde</sup>
12	1228,78 ± 9,73 <sup>efg</sup>	153,00 ± 13,06 <sup>bc</sup>	13,31 ± 1,40 <sup>cd</sup>	64,30 ± 1,60 <sup>abc</sup>	0,47 ± 0,16 <sup>ef</sup>	3,27 ± 0,49 <sup>b</sup>	2,23 ± 0,04 <sup>cde</sup>
13 (C)	1271,99 ± 25,29 <sup>d</sup>	123,66 ± 7,36 <sup>defgh</sup>	13,98 ± 0,61 <sup>bcd</sup>	64,20 ± 2,20 <sup>abc</sup>	0,20 ± 0,07 <sup>jk</sup>	1,87 ± 0,12 <sup>fg</sup>	2,29 ± 0,17 <sup>cd</sup>
14 (C)	1334,21 ± 24,90 <sup>c</sup>	127,02 ± 12,83 <sup>defg</sup>	14,52 ± 0,23 <sup>bc</sup>	62,40 ± 0,50 <sup>bcd</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>gh</sup>	2,59 ± 0,27 <sup>d</sup>	2,35 ± 0,06 <sup>bcd</sup>
15 (C)	1176,16 ± 21,03 <sup>ijk</sup>	111,04 ± 14,81 <sup>gh</sup>	13,04 ± 0,70 <sup>cde</sup>	58,80 ± 0,30 <sup>d</sup>	0,15 ± 0,02 <sup>k</sup>	1,62 ± 0,16 <sup>gh</sup>	2,24 ± 0,09 <sup>de</sup>
16 (C)	1265,47 ± 17,01 <sup>de</sup>	113,80 ± 4,64 <sup>fgh</sup>	11,87 ± 0,82 <sup>de</sup>	58,60 ± 0,60 <sup>d</sup>	0,26 ± 0,04 <sup>hij</sup>	1,26 ± 0,04 <sup>i</sup>	2,13 ± 0,26 <sup>efg</sup>
17 (C)	1265,48 ± 17,61 <sup>de</sup>	121,59 ± 2,31 <sup>defgh</sup>	12,35 ± 0,22 <sup>cde</sup>	59,50 ± 3,90 <sup>cd</sup>	0,22 ± 0,04 <sup>ijk</sup>	2,12 ± 0,31 <sup>ef</sup>	2,08 ± 0,13 <sup>g</sup>
<i>p</i> (Normalidade) <sup>3</sup>	0,56	0,07	0,51	0,11	0,64	0,73	0,76
<i>p</i> (Levene) <sup>4</sup>	0,59	0,34	0,89	0,89	0,42	0,15	0,10
<i>p</i> (ANOVA) <sup>5</sup>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

(C) = ponto central. <sup>1</sup>Valores expressos como médias ( $n = 3$ ). <sup>2</sup>Atividade antioxidante pelos métodos de FRAP, ABTS e DPPH. <sup>3</sup>Valores obtidos pelo teste de normalidade (Anderson-Darling). <sup>4</sup>Valores obtidos pelo teste de homogeneidade de variâncias (Levene). <sup>5</sup>Valores obtidos pela análise de variância (ANOVA).  
Diferentes letras na mesma coluna representam resultados com diferença estatística, conforme teste Fisher LSD ( $p \leq 0,05$ ).

O conteúdo de CFT variou entre 1136,63 (ensaio 5) a 1401,43 (ensaio 10) mg/100 g. A análise de regressão múltipla mostrou que os fatores, temperatura e tempo afetaram significativamente o teor de CFT. O modelo não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,92$ ) e pode explicar 78,50% de toda a variância nos dados ( $r^2_{aj} = 0,71$ ). A temperatura no modelo linear aumentou a extração de compostos fenólicos ( $x_1$ ) e o tempo no modelo quadrático ( $x_2^2$ ) apresentou efeito negativo (**Eq. 1**).

$$Y_{CFT} = 1268,73 + 69,98x_1 - 76,07x_2^2 \quad (1)$$

Tempos prolongados de extração podem levar à decomposição de compostos fenólicos e vaporização de solventes, afetando a transferência de massa entre solvente-soluto (PEDRO, GRANATO e ROSSO, 2016). Por outro lado, a elevação da temperatura aumenta a solubilidade de compostos e reduz o tempo de extração.

O teor de CFT da goji berry orgânica (1401,43 mg/100 g), em comparação com outras variedades de frutas *berry*, foi maior que em *blueberry*, morangos e *blackberry*, 305,38, 624,92 e 850,52 mg/100 g, respectivamente (SOUZA *et al.*, 2014 ). Segundo Vasco, Ruales e Kamal-Eldin (2008), as goji berries orgânicas podem ser consideradas excelentes fontes de compostos fenólicos (CFT > 500 mg/100 g).

Teores de FT variaram de 102,82 (ensaio 6) a 183,32 (ensaio 11) mg/100 g. O modelo para extração de flavonoides não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,96$ ) e pode explicar 97,20% da variação nos dados ( $r^2_{aj} = 0,94$ ). A temperatura no modelo linear ( $x_1$ ) e quadrático ( $x_1^2$ ), bem como a interação entre esta variável e o tempo ( $x_1x_2$ ), tenderam a aumentar o teor de FT (efeitos positivos). O modelo previsto pode ser descrito pela **Eq. (2)**.

$$Y_{FT} = 119,20 + 21,58x_1 + 25,08x_1^2 + 13,62x_1x_2 \quad (2)$$

O teor de AT variou de 4,72 (ensaio 3) a 21,02 (ensaio 5) mg/100 g. A aplicação da MSR no teor de AT mostrou que o modelo pode explicar 98,10% de toda a variância nos dados ( $r^2_{aj} = 0,95$ ) e não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,97$ ). A temperatura no modelo linear ( $x_1$ ) e no modelo quadrático ( $x_1^2$ ), a relação sólido:solvente ( $x_3$ ) e a interação entre tempo e sólido:solvente ( $x_2x_3$ ) mostraram efeitos negativos no teor de AT. As interações entre temperatura e tempo ( $x_1x_2^2$ ) no modelo quadrático, temperatura e relação sólido:solvente nos modelos linear ( $x_1x_3$ ) e quadrático ( $x_1^2x_3$ ) tenderam ao aumento do conteúdo de AT, como mostrado na **Eq. (3)**.

$$Y_{AT} = 13,25 - 3,22x_1 - 2,69x_1^2 - 3,98x_3 + 1,92x_1x_3 - 3,23x_2x_3 + 6,66x_1x_2^2 + 3,90x_1^2x_3 \quad (3)$$

A temperatura aumenta o coeficiente de difusão, enquanto que a viscosidade do solvente diminui, e a solubilidade dos compostos aumenta. No entanto, temperaturas

elevadas (acima de 25 °C) podem degradar alguns flavonoides, como antocianinas, levando a ruptura de ligações covalentes e hidrólise do cátion *flavilium* (PEDRO, GRANATO e ROSSO, 2016).

O conteúdo de CT variou de 48,60 (ensaio 10) a 67,90 (ensaio 9) mg/100 g. O modelo não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,80$ ) e pode explicar 93% da variação nos dados ( $r^2_{aj} = 0,88$ ). O tempo ( $x_2$ ), a interação entre esse fator e a temperatura ( $x_1x_2$ ) e a relação sólido:solvente ( $x_1x_3$ ) no modelo linear diminuiu a extração de carotenoides (**Eq. 4**).

$$Y_{CT} = 60,20 - 0,34x_2 - 0,42x_1x_2 - 0,88x_1x_3 \quad (4)$$

Os carotenoides são extremamente sensíveis às altas temperaturas. Portanto, altas temperaturas combinadas com longos tempos de extração aceleram o processo de degradação de carotenoides (WENG-PING *et al.*, 2008).

A atividade antioxidante determinada pelo método de FRAP variou de 0,22 (ensaio 17) a 1,21 (ensaio 8) mmolTE/100 g. A MSR mostrou que o modelo pode explicar 98,60% da variação nos dados ( $r^2_{aj} = 0,97$ ) e não apresenta falta de ajuste ( $p = 0,83$ ). A temperatura ( $x_1^2$ ) e a interação entre temperatura e tempo ( $x_1^2x_2$ ) no modelo quadrático, relação sólido:solvente nos modelos linear ( $x_3$ ) e quadrático ( $x_3^2$ ) mostraram uma tendência para aumentar a atividade antioxidante. A interação entre a relação sólido:solvente e temperatura ( $x_1x_3$ ) e tempo ( $x_2x_3$ ) no modelo linear apresentaram tendência a diminuir a atividade antioxidante. O modelo previsto pode ser descrito pela **Eq. (5)**.

$$Y_{FRAP} = 0,23 + 0,23x_3 - 0,14x_1x_3 - 0,22x_2x_3 + 0,25x_1^2 + 0,21x_3^2 + 0,12x_1^2x_2 \quad (5)$$

A atividade antioxidante para o ensaio de ABTS variou entre 0,42 (ensaio 3) e 4,64 (ensaio 10) mmolTE/100 g. O modelo mostrou que os valores de ABTS podem explicar 84,50% da variação nos dados ( $r^2_{aj} = 0,75$ ) e não apresentava falta de ajuste ( $p = 0,57$ ). A temperatura nos modelos linear ( $x_1$ ) e quadrático ( $x_1^2$ ) afetou positivamente a atividade antioxidante (**Eq. 6**).

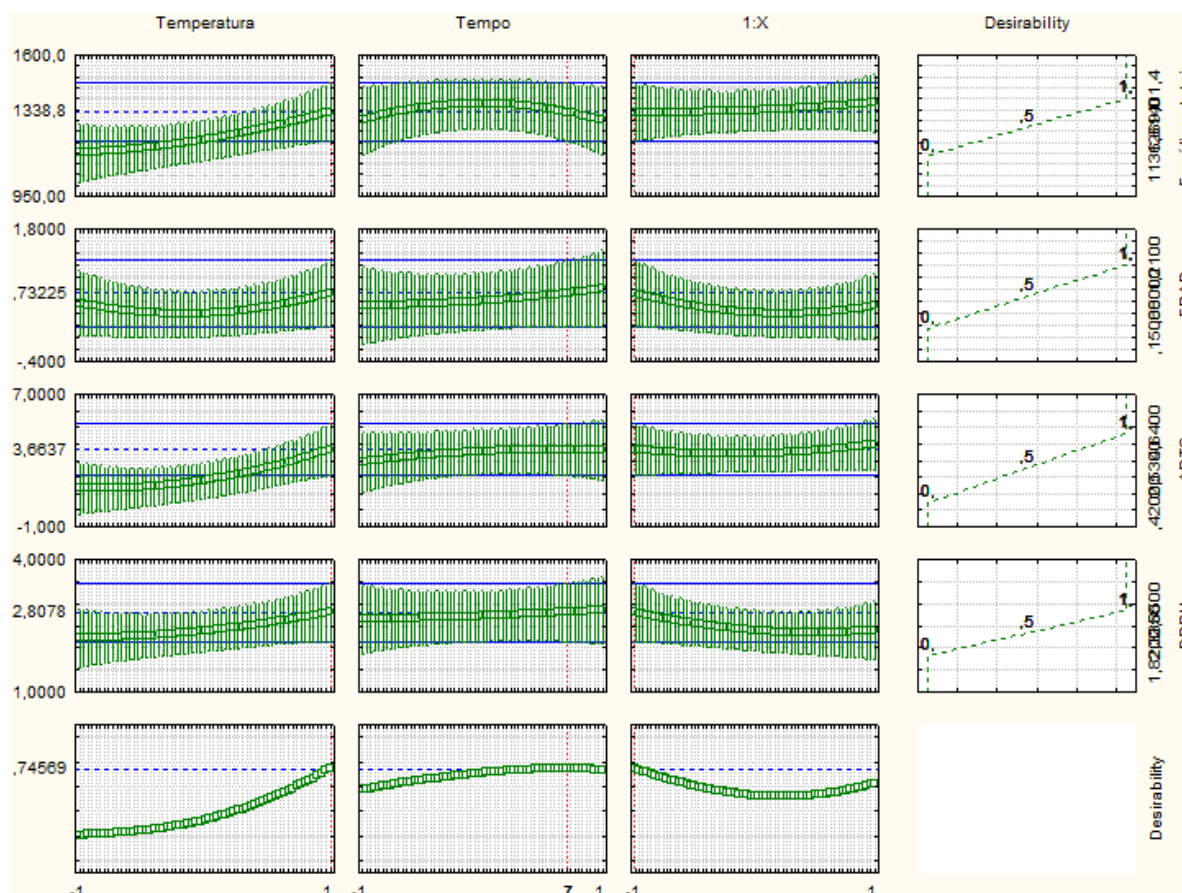
$$Y_{ABTS} = 1,95 + 0,88x_1 + 0,71x_1^2 \quad (6)$$

A atividade antioxidante determinada pelo ensaio de DPPH variou de 2,08 (ensaio 17) a 2,85 (ensaio 9) mmolTE/100 g. A aplicação da MSR mostrou que o modelo pode explicar 84% da variação nos dados ( $r^2_{aj} = 0,74$ ) e não apresentou falta de ajuste ( $p = 0,54$ ). A temperatura ( $x_1^2$ ) e a relação sólido:solvente ( $x_3^2$ ) no modelo quadrático, influenciou positivamente a atividade antioxidante. A interação entre os dois fatores ( $x_1x_3$ ) no modelo linear, mostrou efeitos negativos, conforme **Eq. (7)**.

$$Y_{\text{DPPH}} = 2,23 + 0,15x_1^2 + 0,17x_3^2 - 0,16x_1x_3 \quad (7)$$

Para todos os ensaios antioxidantes, a temperatura foi o fator que apresentou o maior efeito sobre a atividade antioxidante. A temperatura aumenta a solubilidade de compostos com diferentes estruturas moleculares através da transferência de massa, com uma maior penetração do solvente na matriz vegetal (CACACE e MAZZA, 2003). Foram encontrados na literatura efeitos semelhantes, com extratos fenólicos de maçã (ALBERTI *et al.*, 2014), *Berberis asiatica* (BELWAL *et al.*, 2016) e tomate (LI *et al.*, 2012).

A otimização simultânea baseada na função desejável foi realizada com o objetivo de maximizar o conteúdo de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de extratos da goji berry orgânica (**Figura 16**). As condições de 162 min a 45 °C e a relação sólido:líquido de 1:10 (m/v) podem ser consideradas adequadas para obter a solução otimizada na combinação destas variáveis. A função geral desejável obtida para esta solução foi de 0,75. As condições otimizadas foram aplicadas à extração experimental de compostos fenólicos e à determinação da atividade antioxidante. Os valores médios observados e previstos, e os erros absolutos calculados (EA), foram: compostos fenólicos totais (mg/100 g) [observados (1338,80) e preditos (1335,54), EA = -0,44%], e atividade antioxidante (mmolTE/100 g) pelos ensaios de FRAP [observado (0,7323) e predito (0,7437), EA = 1,42%], ABTS [observado (3,66) e predito (3,63), EA = -0,51%] e DPPH [observado (2,81) e previsto (2,87), AE = -1,13%].

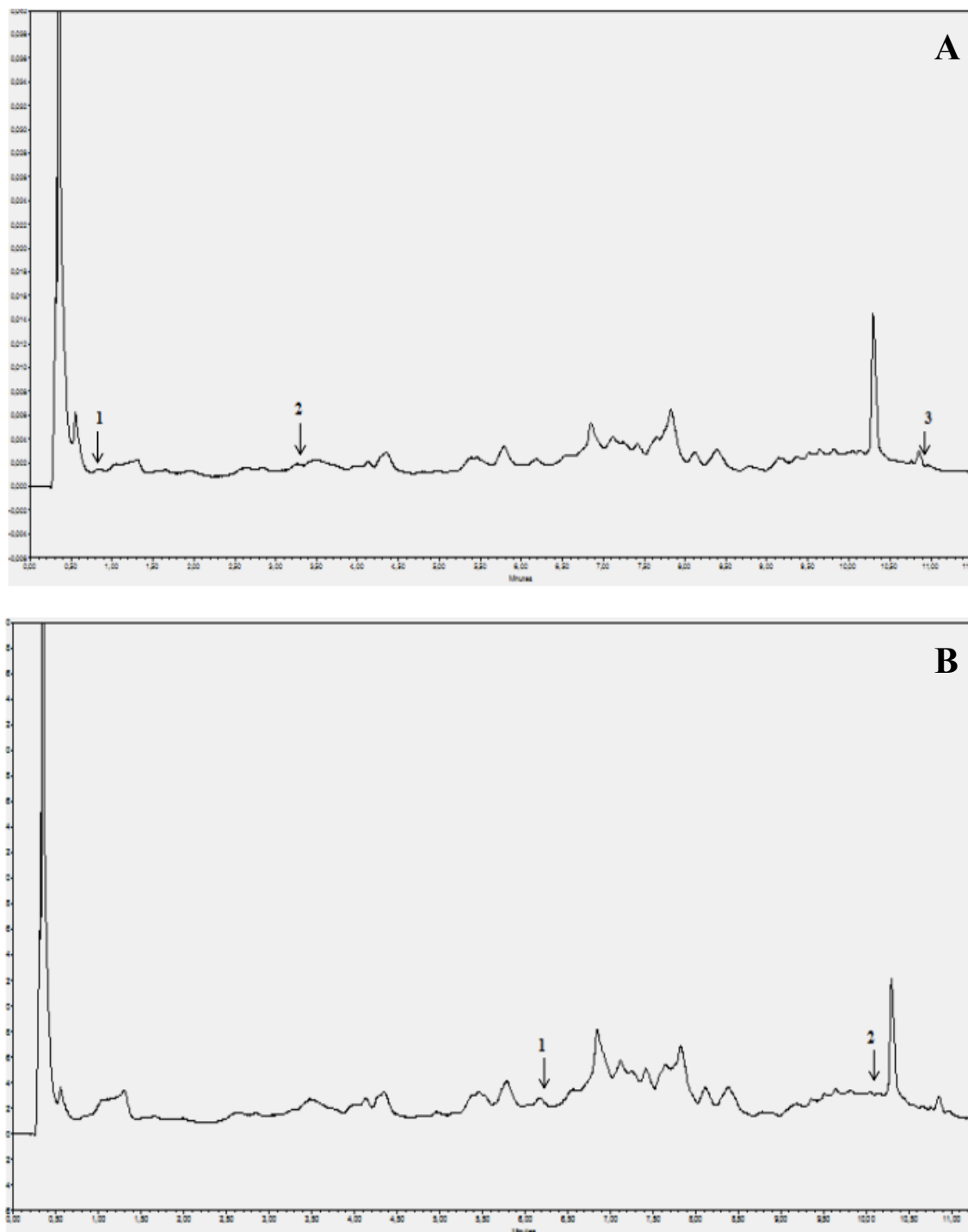


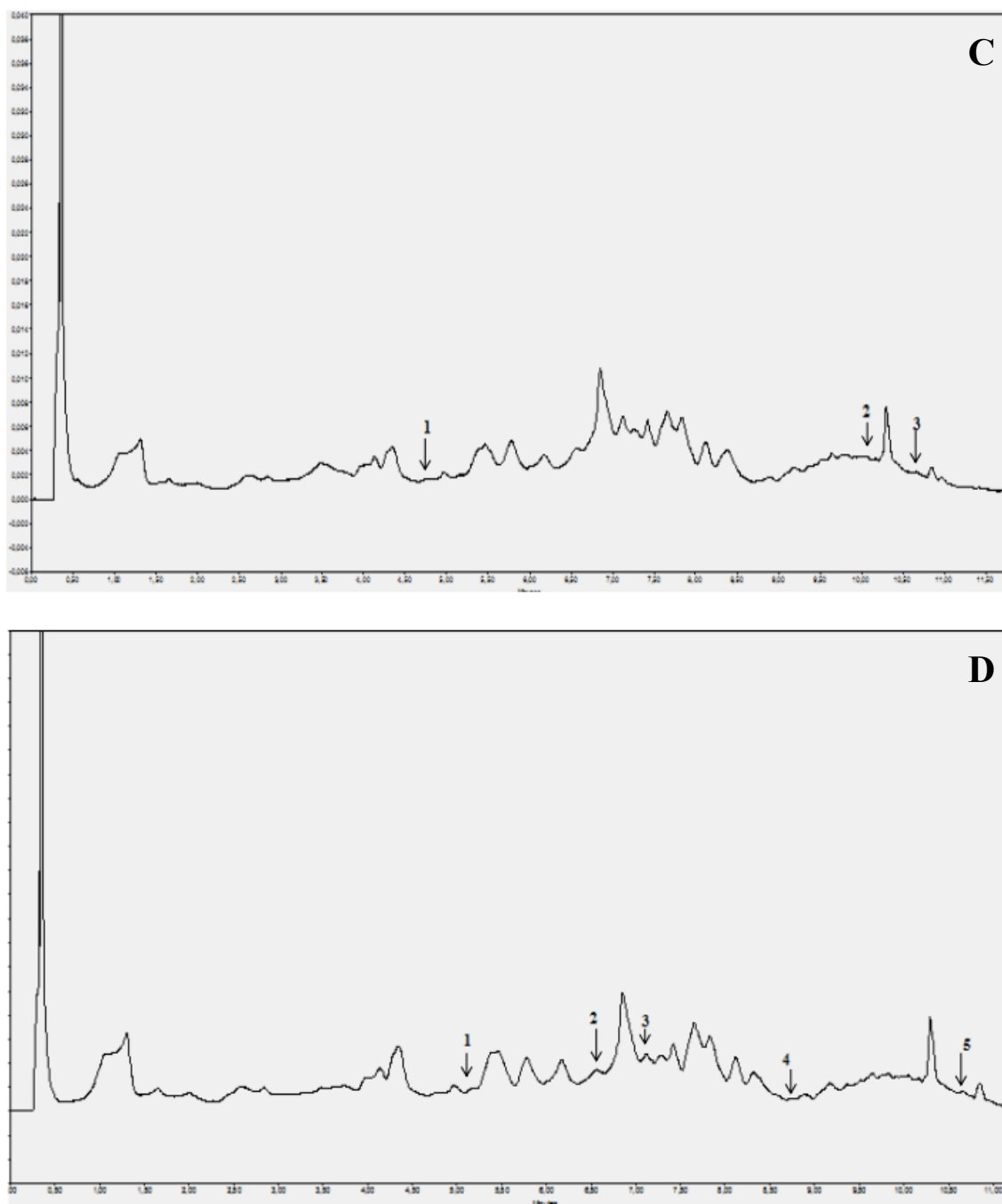
**Figura 16** Valores médios observados e função desejável obtidos para os extratos fenólicos da goji berry orgânica através da otimização simultânea.

Um modelo pode ser usado para prever uma resposta baseada nos valores de fatores específicos (variáveis independentes) quando as equações de regressão geradas pela MSR são estatisticamente significativas (o valor  $p$  está abaixo do valor  $\alpha$  estipulado), podem explicar mais de 70% da variabilidade nos dados ( $r^2 > 0,70$ ) e a falta de ajuste representa um valor de  $p\text{-lack of fit} > 0,05$  (GRANATO, CALADO e JARVIS, 2014). No presente estudo, todos os modelos de regressão foram estatisticamente significativos ( $p \leq 0,05$ ), explicaram mais de 78% do conjunto de dados ( $r^2_{aj} > 0,71$ ), ajustaram adequadamente os dados experimentais ( $p\text{-lack of fit} > 0,54$ ) e os valores previstos e observados apresentaram erros absolutos abaixo de 10%. Portanto, o modelo de MSR proposto pode ser considerado significativo e pode ser utilizado para fins preditivos.

### 3.3 Análise de CLUE do extrato otimizado

A identificação e o conteúdo de ácidos fenólicos e flavonoides no extrato otimizado [162 min, 45 °C e relação sólido:líquido 1:10 (m/v)] da goji berry orgânica foram determinados por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE). No extrato otimizado, foram identificados oito ácidos fenólicos (siringico, clorogênico, gálico, cafeico, *p*-cumárico, 4-hidroxibenzoico, ferulico e trans-cinâmico) e cinco flavonoides (rutina, naringina, quercetina, catequina e kaempferol) (**Figura 17**).





**Figura 17** Perfil cromatográfico dos compostos fenólicos de frutas goji orgânicas: (A) 260 nm – ácido gálico (1), ácido 4-hidroxibenzoico (2), kaempferol (3); (B) 270 nm – ácido siríngico (1), rutina (2); (C) 280 nm – catequina (1), naringina (2), ácido trans-cinâmico (3); (D) 300 nm – ácido cafeico (1), ácido clorogênico (2), ácido *p*-cumárico (3), ácido ferulico (4), quercetina (5).

A **Tabela 09** mostra o conteúdo dos ácidos fenólicos e flavonoides extraídos da goji berry orgânica nas condições otimizadas. Foram determinados elevados conteúdos

dos ácidos siríngico e clorogênico, 946,33 e 130,00 mg/100 g, respectivamente. Os principais flavonoides presentes no extrato otimizado foram rutina e naringina, 665,00 e 213,00 mg/100 g, respectivamente. O ácido siríngico foi identificado pela primeira vez em amostras de goji berry (presente estudo). Diferentes autores mencionam a rutina e o ácido clorogênico como sendo os principais compostos fenólicos presentes em frutas goji de diferentes espécies. Além disso, a quercetina também é encontrada em frutas goji, pois é derivada da deglicosilação da rutina (POTTERAT, 2010). Inbaraj *et al.* (2010) identificaram a quercetina (43,86 mg/100 g) e o ácido clorogênico (23,70 mg/100 g) como principais fenólicos em amostras de goji berry. Qian, Liu e Huang (2004) determinaram alto teor de rutina (3,40 mg/mL) e ácido clorogênico (0,23 mg/mL) em frutas *Lycium Chinense* Mill. Wang *et al.* (2010) também identificaram o ácido clorogênico e a rutina como principais compostos fenólicos em frutas *Lycium barbarum*.

**Tabela 09** Parâmetros cromatográficos e quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides da goji berry orgânica.

Padrões químicos	Tempo de retenção (min)	Banda UV (nm)	Conteúdo <sup>1</sup> (mg/100g)
Ácido siríngico	6,31	270	946,33 ± 7,89 <sup>a</sup>
Ácido clorogênico	5,57	300	130,00 ± 2,52 <sup>d</sup>
Ácido gálico	0,97	260	86,33 ± 3,02 <sup>e</sup>
Ácido cafeico	5,13	300	86,25 ± 3,24 <sup>e</sup>
Ácido <i>p</i> -cumárico	7,00	300	55,33 ± 1,33 <sup>g</sup>
Ácido 4-hidroxibenzoico	3,31	260	37,33 ± 2,26 <sup>h</sup>
Ácido ferulico	8,42	300	18,67 ± 0,65 <sup>i</sup>
Ácido trans-cinâmico	10,83	280	2,67 ± 0,12 <sup>j</sup>
Rutina	10,26	270	665,00 ± 4,55 <sup>b</sup>
Naringina	10,38	280	213,00 ± 2,71 <sup>c</sup>
Quercetina	11,22	300	69,33 ± 3,78 <sup>f</sup>
Catequina	4,89	280	37,00 ± 1,22 <sup>h</sup>
Kaempferol	11,70	260	35,67 ± 2,08 <sup>h</sup>

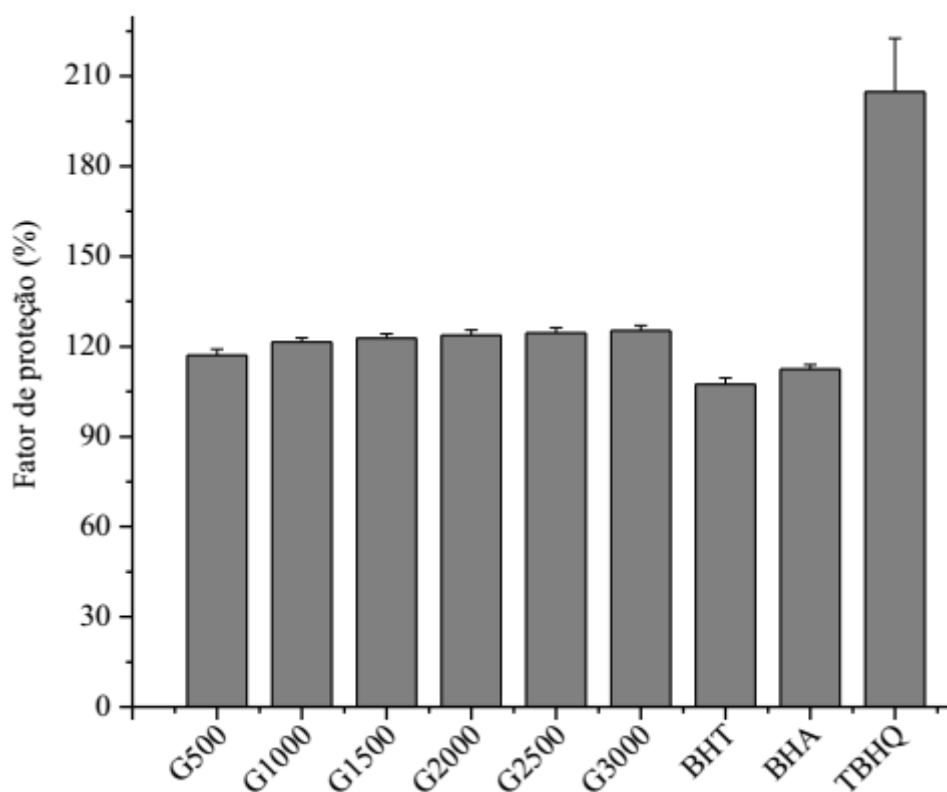
<sup>1</sup>Valores expressos como médias e desvio padrão ( $n = 3$ ). Em cada coluna, diferentes letras indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se dizer que a goji berry cultivada no sistema orgânico apresenta como principal composto fenólico, o ácido siríngico, composto identificado pela primeira vez na literatura.



### 3.4 Teste de Rancimat

O teste Rancimat é baseado no aumento da condutividade elétrica devido à formação de produtos secundários de oxidação lipídica (REZAIE *et al.*, 2015), e avalia a atividade antioxidante de uma amostra. Os fatores de proteção (FP) para os óleos de soja contendo o extrato otimizado de frutas goji (500 a 3000 mg/kg) e os antioxidantes sintéticos BHT, BHA e TBHQ (100 mg/kg) estão apresentados na **Figura 18**.



**Figura 18** Fator de proteção (FP) de diferentes concentrações do extrato orgânico otimizado e antioxidantes sintéticos (BHT, BHA e TBHQ) adicionados ao óleo de soja.

Altos valores de fator FP indicam elevada capacidade de proteção à oxidação, ou seja, alta atividade antioxidante. Os extratos fenólicos (G500, G1000, G1500, G2000, G2500 e G3000) exibiram um aumento dependente da concentração na atividade antioxidante, apresentando uma maior estabilização oxidativa ( $p \leq 0,05$ ) comparada ao BHT e BHA (**Figura 18**). No entanto, o maior FP foi observado para o óleo adicionado do TBHQ, e pode ser explicado pela alta estabilidade à temperatura e menor volatilidade deste antioxidante em relação ao BHT e BHA. Além disso, a presença de duas hidroxilas na sua estrutura permite maior facilidade na transferência de átomos de

hidrogênio, estabilizando rapidamente radicais livres formados durante o processo oxidativo (ARAÚJO, 2006).

Os altos valores de FP apresentados pelo extrato otimizado da goji berry orgânica podem ser explicados pela presença de diferentes compostos antioxidantes identificados por CLUE (item 3.3). Os ácidos siríngico e clorogênico, e os flavonoides, rutina e naringina podem ter sido os principais responsáveis pelo efeito de proteção. Ácidos benzoicos, como o siríngico, têm alto potencial antioxidante, devido à presença de duas metoxilas na estrutura molecular. A atividade antioxidante do ácido clorogênico está relacionada à presença de um grupo orto-di-hidroxifenil (catecol). Além disso, apresenta características estruturais importantes na estabilização de espécies reativas: alteração no número e posição de grupos hidroxil, doação ou retirada de elétrons e modificações da função carboxílica que incluem o processo de esterificação e amidação (RAZZAGHI-ASL *et al.*, 2013). Flavonoides atuam como antioxidantes primários ao unir grupos hidroxílicos fenólicos a estruturas aromáticas. Podem também atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio, eliminadores de radicais superóxido e oxigênio singlete, e quelantes de metais (FENNEMA, 1996).

Resultados similares ao presente estudo foram encontrados na literatura. Comunian *et al.* (2016) mostraram que o extrato de rutina foi efetivo contra a oxidação acelerada por Rancimat do óleo de echium microencapsulado. A adição de extratos de casca de batata (ricos em ácido clorogênico) em óleos de soja mostrou alta estabilidade oxidativa (FRANCO *et al.*, 2016). Yang *et al.* (2016) observaram melhor efeito de proteção do óleo de soja adicionado de extrato de alecrim quando comparado com BHT e BHA. A capacidade antioxidante do extrato de alecrim foi atribuída à presença de diterpenos fenólicos que eliminam o oxigênio singlete, radicais hidroxílicos e peroxílicos, evitando a oxidação lipídica.

Os valores de FP de óleos com extrato de goji berry orgânica foram significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) que óleos incorporados com os antioxidantes BHT e BHA. Estes resultados indicam que o extrato de goji berry pode ser um potencial substituto de antioxidantes sintéticos e estabilizador contra a deterioração oxidativa de óleos comestíveis.

## CONCLUSÃO

O metanol e o etanol foram os solventes mais eficientes na extração de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante de frutas goji orgânicas. O solvente EtOH70 foi escolhido para a extração de compostos bioativos da fruta orgânica através de um planejamento experimental, por ser um solvente atóxico e seguro para aplicação na indústria alimentícia. A MSR mostrou-se útil para avaliar o efeito da temperatura, tempo e relação sólido-líquido na extração de compostos fenólicos de frutas goji. A análise estatística com base no planejamento experimental Box-Behnken mostrou que a extração a 45 °C durante 162 min usando uma relação sólido:solvente de 1:10 (m/v) maximizou o conteúdo de compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro*. Os principais compostos fenólicos identificados nos extratos otimizados de goji berry orgânica, através da CLUE foram os ácidos fenólicos, siríngico e clorogênico, e os flavonoides, rutina e naringina. Os resultados mostraram que, em comparação com os antioxidantes sintéticos (BHT e BHA), o extrato orgânico apresentou maior eficiência contra a deterioração oxidativa do óleo de soja. O uso da técnica orgânica de cultivo e o alto conteúdo de antioxidantes extraídos com aplicação de um solvente atóxico sugerem que o extrato da goji berry orgânica pode ser aplicado na indústria de processamento de alimentos como um antioxidante seguro e natural.

## CAPÍTULO IV

---

### Fitoquímicos e atividade biológica de futas *Lycium barbarum* L. orgânicas e convencionais

#### RESUMO

Frutas *Lycium barbarum* L. cultivadas no sistema orgânico e convencional foram investigadas quanto ao conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante, teor de carotenoides e ácido ascórbico, além da atividade antimicrobiana *in vitro*. Fenólicos de extratos e amostras sólidas (*Quencher*) foram obtidos por *shaker* e ultrassom e quantificados por Folin-Ciocalteu e *Fast Blue BB*. Carotenoides e ácido ascórbico (L-ascórbico e L-dehidroascórbico) foram quantificados por CLAE. O processo de ultrassom mostrou maior conteúdo ( $p \leq 0,05$ ) de fenólicos totais e atividade antioxidante em extratos e amostras sólidas orgânicas (803,34 a 7076,43 mg/100 g, 11,45 a 234,11 mmolTE/100 g) e convencionas (763,01 a 6366,30 mg/100 g, 10,27 a 117,12 mmolTE/100 g). O método Folin-Ciocalteu apresentou para extratos e amostras sólidas de goji berry maiores ( $p \leq 0,05$ ) conteúdos de fenólicos totais (912,42 a 6350,54 mg/100 g). O conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram entre 3 a 20 vezes maiores em amostras sólidas (*Quencher*), comparados aos extratos. A goji berry orgânica e convencional apresentaram como principais carotenoides no extrato insaponificado (all-*E*)-luteína (0,16 e 0,13 mg/100 g) e (all-*E*)-zeaxantina (0,28 e 0,24 mg/100 g). No extrato saponificado foi identificada apenas (all-*E*)-zeaxantina (8,36 e 6,61 mg/100 g). Frutas orgânicas e convencionais mostraram conteúdos (em mg/100 g) de ácido ascórbico total (101,83 e 80,46), L-ascórbico (34,88 e 40,87) e L-dehidroascórbico (66,95 e 39,60) superiores a outras frutas fontes de vitamina C (laranja, morango e *kiwi*). Os extratos fenólicos da goji orgânica e convencional mostraram atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e negativas, com concentrações mínimas inibitórias (CMI's) de 10 a 40 e 40 a 80 mg/mL, respectivamente. Frutas orgânicas apresentaram maior conteúdo de fenólicos totais, atividade antioxidante, (all-*E*)-zeaxantina, vitamina C e atividade antimicrobiana com relação a frutas convencionais, sendo um importante aditivo natural na indústria alimentícia.

**Palavras-chave:** método *Quencher*, *Fast Blue BB*, carotenoides, ácido ascórbico.

#### 1 INTRODUÇÃO

O consumo de alimentos ricos em fitoquímicos vem aumentando em todo o mundo. São sintetizados durante o desenvolvimento da planta, e também em resposta a diferentes situações de estresse, tais como infecções, ferimentos e radiação ultravioleta (HAMINIUK *et al.*, 2012). No organismo humano, os fitoquímicos inibem espécies oxidantes reativas e radicais livres produzidos em processos fisiológicos (PAREDES-

LÓPEZ *et al.*, 2010). Espécies reativas estão associadas ao desenvolvimento de doenças crônicas como cardiovasculares, diabetes tipo 2 e tumores cancerígenos (LIU, 2007).

O principal grupo de fitoquímicos encontrados em frutas e vegetais é dos compostos fenólicos, o qual inclui flavonoides, taninos e ácidos fenólicos (HAMINIUK *et al.*, 2012). Compostos responsáveis pela coloração de frutas e vegetais e alguns ácidos orgânicos também são importantes antioxidantes (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

As goji berries (*Lycium barbarum* L.), são frutas ricas em fitoquímicos com funções antioxidantes nas plantas e no organismo humano. O ácido clorogênico e a rutina são os principais compostos fenólicos presentes nestas frutas e vêm sendo relacionados a efeitos antitumorais, pois promovem proteção à peroxidação lipídica e ao estresse oxidativo (HUANG *et al.*, 2003; CHAO *et al.*, 2006; FENG *et al.*, 2010). Extratos fenólicos de frutas goji apresentam também efeito antimicrobiano sobre diferentes bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella Typhi*, *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis* (JIN *et al.*, 1995; DAHECH *et al.*, 2013).

O ácido ascórbico (Vitamina C) é também um composto com importantes funções biológicas, encontrado em grandes quantidades em frutas goji berry. Zhang *et al.* (2011) demonstrou que a vitamina C proveniente de frutas goji induziu a morte de células tumorais do tipo adenocarcinoma cervical (Hela).

Os carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pela intensa coloração laranja das goji berries (DA SILVA *et al.*, 2014). A zeaxantina é o principal carotenoide presente em frutas *Lycium barbarum* L. e está associada à proteção contra a degeneração macular em idosos, pois quando consumida acumula-se na retina ocular (MOELLER, JACQUES e BLUMBERG, 2000; INBARAJ *et al.*, 2008).

Compostos antioxidantes naturais vêm sendo cada vez mais utilizados por diferentes ramos da indústria alimentícia, portanto, é importante a obtenção de extratos vegetais de qualidade e com alto rendimento. Para isso, a seleção da matéria prima e do método de extração são extremamente relevantes (SASIDHARAN *et al.*, 2011). Plantas orgânicas tendem a produzir extratos bioativos mais seguros e nutritivos que plantas cultivadas no sistema convencional (GOMIERO, PIMENTEL e PAOLETTI, 2011). Métodos que utilizam baixo tempo de extração, menor quantidade de solvente e mantêm as características biológicas de compostos bioativos, como o ultrassom, são desejáveis (AZMIR *et al.*, 2013).

Na literatura, poucos estudos relacionam as diferenças entre fitoquímicos de vegetais produzidos com diferentes técnicas de cultivo e nenhum estudo foi encontrado sobre as diferenças entre fitoquímicos de frutas *Lycium barbarum* L. cultivadas no sistema orgânico e convencional. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar frutas goji orgânicas e convencionais quanto a: (1) diferentes métodos de extração e de determinação de fenólicos totais, além da atividade antioxidante; (2) perfil cromatográfico de carotenoides e ácido ascórbico (L-ascórbico e L-dehidroascórbico); (3) atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos fenólicos.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

#### 2.1.1 Reagentes

Os reagentes TPTZ, *Fast Blue* BB, Folin-Ciocalteu e padrões químicos de grau cromatográfico (pureza  $\geq 95\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os solventes, hexano ( $C_6H_{14}$ ), etanol ( $C_2H_6O$ ), acetona ( $C_3H_6O$ ), acetonitrila ( $C_2H_3N$ ) e metanol ( $CH_3OH$ ) foram adquiridos da J.T.Baker (Loughborough, EUA). Os demais reagentes foram de grau analítico e a água ultrapura foi obtida por um sistema de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

#### 2.1.2 Amostra

Conforme descrito anteriormente no item 2.1.2 do Capítulo II.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Compostos fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos totais, como descrito no item 2.2.1.2 deste capítulo, foi determinada nos extratos (extraídos conforme item 2.2.1.1 deste capítulo) e nas amostras sólidas (*Quencher*) da goji berry orgânica e convencional, utilizando os métodos de *shaker* e ultrassom, no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid).

### 2.2.1.1 Extratos fenólicos

A extração de compostos fenólicos de amostras orgânicas e convencionais da goji berry foi realizada através da metodologia proposta por Liyana-Pathirana e Shahidi (2005), com modificações. As condições de extração foram obtidas por otimização conforme Capítulo III, e duas formas de extração foram utilizadas, *shaker* e ultrassom. Um grama de amostra foi misturado com 10 mL de etanol 70/30 (v/v). A mistura foi então agitada em um agitador *shaker* (Memmert WB14, Schwabach, Alemanha) a 45 °C durante 162 min. As mesmas condições foram aplicadas na extração por ultrassom (Selecta Ultrasons-H 288071, Barcelona, Espanha). O sobrenadante foi obtido por centrifugação (MPW-350R, Varsóvia, Polônia) a 4300 rpm por 20 min. O volume foi completado para 50 mL com etanol 70/30 (v/v).

### 2.2.1.2 Quantificação de compostos fenólicos totais

Os métodos de Folin-Ciocalteu e *Fast Blue* BB foram utilizados para a quantificação de compostos fenólicos totais dos extratos obtidos conforme item 2.2.1.1 deste capítulo e das amostras sólidas trituradas conforme método *Quencher*, proposto por Condezo-Hoyos *et al.* (2015).

O método de Folin-Ciocalteu foi realizado para os extratos fenólicos como descrito no item 2.2.3 do Capítulo III. Para as amostras sólidas, 1 mg de amostra foi adicionada em tubos *falcon* juntamente com 600 µL de água, 200 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, e então agitados. Em seguida foram adicionados 4 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (75 g/L, m/v) e 5 mL de água, e mantidos sob agitação por 35 min. Por fim, a mistura foi filtrada e a absorbância determinada a 750 nm (ThermoFisher-Scientific, Genesys-105, Waltham, Massachusetts, EUA), a partir de uma curva de padrão de ácido gálico ( $y = 0,0180x + 0,0494$ ;  $R^2 = 0,9877$ ).

A quantificação de fenólicos realizada pelo método de *Fast Blue* BB foi segundo metodologia proposta por Medina (2011). Para os extratos, foram adicionados em tubos de ensaio, 4 mL de amostra diluída (1/10, v/v), 0,4 mL do reagente *Fast Blue* BB 0,1% (v/v), 0,4 mL de NaOH 5% (m/v). Os tubos foram agitados no escuro durante 90 min e a absorbância determinada a 420 nm (ThermoFisher-Scientific, Genesys-105, Waltham, Massachusetts, EUA), a partir de uma curva de padrão de ácido gálico ( $y = 0,0096x + 0,0169$ ;  $R^2 = 0,9974$ ). Fenólicos em amostras sólidas foram determinados pela adição de 1 mg de amostra, 0,4 mL do reagente *Fast Blue* BB 0,1% (v/v), 0,4 mL de NaOH 5%

(m/v) e 4 mL de água. Os tubos foram agitados durante 1 h, filtrados e as absorbâncias determinadas a 420 nm.

### 2.2.2 Carotenoides totais

Os carotenoides (fração insaponificada) das amostras de goji berry foram extraídos de acordo com o método proposto por Nagata e Yamashita (1992), com modificações, no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). Aproximadamente 150 mg das amostras foram vagarosamente agitadas com 10 mL de uma mistura acetona/hexano (4/6, v/v) durante 5 min. A solução foi filtrada (Whatman n°.4) em um balão volumétrico de 10 mL, e o volume completado com a solução acetona/hexano. O extrato foi saponificado conforme metodologia proposta por Zhao *et al.* (2013). Aos extratos foram adicionados 1,3 mL de hidróxido de potássio em metanol (40%, m/v) e agitados a 56 °C durante 20 min. Então, foram resfriados e adicionados 10 mL de hexano e o volume completado para 30 mL com sulfato de sódio (10%, m/v). A solução foi agitada e deixada em repouso durante 10 min no escuro para separação de fases. Por fim, o sobrenadante foi coletado para análises cromatográficas.

#### 2.2.2.1 Perfil cromatográfico de carotenoides

O perfil dos carotenoides extraídos conforme descrito no item 2.2.2 deste capítulo foi avaliado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV-Vis (CLAE), segundo método de Olives-Barba *et al.* (2006). Os dois extratos, insaponificado e saponificado, foram filtrados em uma membrana de PTFE 0,45 µm e 30 µL foram injetados no cromatógrafo, equipado com sistema PU II de bombeamento isocrático (Micron Analítica, SA, Espanha) e detector ultravioleta 100 UV (Knauer - Alemanha). A coluna analítica utilizada (300 x 2 mm, 10 µm) foi Bondapack C18 (Milford, MA, EUA) a 30 °C. A fase móvel consistiu em acetonitrila/metanol (95/5, v/v), fluxo de 0,9 mL/min a 475 nm. As áreas dos picos nos cromatogramas resultantes foram quantificadas por curvas padrões de zeaxantina e luteína.



### 2.2.3 Ácido ascórbico e dehidroascórbico: Vitamina C

A determinação dos ácidos ascórbico e dehidroascórbico foi realizada por CLAE-IR, conforme metodologia descrita por Vazquez-Odériz *et al.* (1994) e Arella *et al.* (1996), no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). Foram pesadas 0,5 g de cada amostra e adicionou-se 25 mL de ácido metafosfórico ( $\text{HPO}_3$ ) a 4,5% (m/v). A mistura foi mantida sob agitação por 15 min, em ambiente protegido da luz. Os extratos foram filtrados em papel filtro e então filtrados em uma membrana de PVDF 0,45  $\mu\text{m}$ . Para determinação da forma reduzida, utilizou-se 3 mL do extrato filtrado, adicionou-se 2,5 mL da solução de L-cisteína a 4% (m/v), sendo ajustado à pH 7 com fosfato dipotássio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ) a 20% (m/v). Após 5 min, o pH foi ajustado à pH 3 com  $\text{HPO}_3$  a 20% (m/v) e o volume completado com água destilada para 10 mL. O extrato foi filtrado em membrana PVDF 0,45  $\mu\text{m}$  e 40  $\mu\text{L}$  foram injetados no cromatógrafo, equipado com sistema PU II de bombeamento isocrático (Micron Analítica, SA, Espanha) e detector ultravioleta 100 UV (Knauer - Alemanha). A coluna utilizada (250 x 4,60 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) foi ODS II da Phenomenex (Torrance, CA, EUA). A fase móvel consistiu em  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,8 mmol/L (pH 2,6), fluxo de 0,9 mL/min a 245 nm. As áreas dos picos nos cromatogramas resultantes foram quantificadas por uma curva padrão de ácido ascórbico.

### 2.2.4 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos extratos fenólicos e das amostras sólidas (*Quencher*) de frutas goji foi determinada pelo método *in vitro* de FRAP, como descrito no item 2.2.7 do Capítulo III, no Departamento de Nutrición y Bromatología II - Facultad de Farmacia (Universidad Complutense de Madrid). A curva padrão foi preparada com Trolox e os resultados expressos em milimol equivalentes de Trolox por 100 g de amostra seca (mmolTE/100 g).

### 2.2.5 Atividade antimicrobiana

A determinação da atividade antimicrobiana dos extratos fenólicos da goji berry orgânica e convencional obtidos conforme item 2.2.1 deste capítulo, foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Para as análises o solvente foi evaporado dos extratos em um evaporador rotativo (Fisatom 802, São Paulo, SP, Brasil) sob pressão reduzida a  $50 \pm 2$  °C.

### 2.2.5.1 Cepas microbianas

Os microorganismos utilizados neste estudo foram cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus cereus* (ATCC 11778), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076). As cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* foram fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Curitiba, PR, Brasil). As cepas de *Bacillus cereus* e *Salmonella enteritidis* foram fornecidas pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná (Curitiba, PR, Brasil) e do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), respectivamente.

### 2.2.5.2 Preparação da suspensão bacteriana

As suspensões bacterianas foram preparadas de acordo com Wiegand, Hilpert e Hancock (2008). A turvação da suspensão inicial foi ajustada em comparação com o padrão McFarland de 0,5. A suspensão inicial continha aproximadamente 108 unidades formadoras de colônias por mL (UFC/mL). Posteriormente, as diluições foram preparadas em solução salina a 0,9% (m/v), 1/100 (v/v) a partir da suspensão bacteriana inicial.

### 2.2.5.3 Microdiluição

A atividade antimicrobiana foi determinada através da concentração mínima inibitória (CMI) usando o método da microdiluição (WIEGAND, HILPERT e HANCOCK, 2008) em microplacas (96 poços). As microdiluições dos extratos fenólicos foram realizadas de 160 a 0,62 mg/mL. O inóculo foi adicionado aos poços e as microplacas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A amoxicilina a 64 mg/L foi utilizada como controle positivo. A atividade antimicrobiana foi detectada pela adição de 20 µL de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,5% (m/v). A CMI foi definida como a menor concentração de extrato necessária para impedir o crescimento microbiano.

### 2.2.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e avaliados usando o teste de normalidade Anderson-Darling. A homogeneidade de variâncias foi

avaliada pelo teste de Brown-Forsythe (Action Software versão 2.5, Estatcamp, Campinas, Brasil). A análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar diferenças significativas. O teste de Fisher LSD foi utilizado para comparar resultados com diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). O teste *t-student* foi utilizado para avaliar diferenças significativas entre a goji berry orgânica e convencional. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., América do Sul, Tulsa, EUA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Compostos fenólicos

O conteúdo de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante das amostras de goji berry foram fortemente influenciados pelos processos de extração (*shaker* e ultrassom) e métodos de determinação (*Fast Blue* BB e Folin-Ciocalteu) empregados. Além disso, foram também observadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre extratos e amostras sólidas (*Quencher*), como mostrado na **Tabela 10**.

**Tabela 10** Fenólicos totais e atividade antioxidante de extratos obtidos por diferentes métodos e amostras sólidas da goji berry orgânica e convencional.

Métodos	Extratos <sup>1</sup>		Amostras sólidas ( <i>Quencher</i> ) <sup>1</sup>	
	Orgânica	Convencional	Orgânica	Convencional
<i>Shaker</i>				
<i>Fast Blue</i> <sup>2</sup>	740,34 ± 10,69 <sup>Bc</sup>	712,88 ± 12,53 <sup>Bd</sup>	5074,03 ± 231,57 <sup>Aa</sup>	2265,95 ± 337,16 <sup>Bb</sup>
Folin <sup>2</sup>	1059,18 ± 20,93 <sup>Ac</sup>	912,42 ± 10,11 <sup>Ad</sup>	5952,43 ± 302,88 <sup>Aa</sup>	4566,06 ± 200,02 <sup>Ab</sup>
Ultrassom				
<i>Fast Blue</i> <sup>2</sup>	803,34 ± 10,12 <sup>Bd</sup>	763,01 ± 6,75 <sup>Bc</sup>	7076,43 ± 342,54 <sup>Aa</sup>	6366,30 ± 257,41 <sup>Bb</sup>
Folin <sup>2</sup>	1094,92 ± 22,05 <sup>Ab</sup>	973,17 ± 12,14 <sup>Ac</sup>	6350,54 ± 147,15 <sup>Ba</sup>	5987,15 ± 342,24 <sup>Ba</sup>
(FRAP) <sup>3</sup>				
<i>Shaker</i>	10,72 ± 0,15 <sup>Bc</sup>	10,09 ± 0,68 <sup>Ac</sup>	46,53 ± 2,54 <sup>Aa</sup>	38,78 ± 2,19 <sup>Bb</sup>
Ultrassom	11,45 ± 0,09 <sup>Ac</sup>	10,27 ± 0,56 <sup>Ac</sup>	234,11 ± 22,66 <sup>Aa</sup>	117,12 ± 18,20 <sup>Ab</sup>

<sup>1</sup>Valores expressos como médias ( $n = 3$ ). <sup>2</sup>mgEAG/100 g. <sup>3</sup>mmolTE/100 g. Em cada linha, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*). Em cada coluna, diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*).

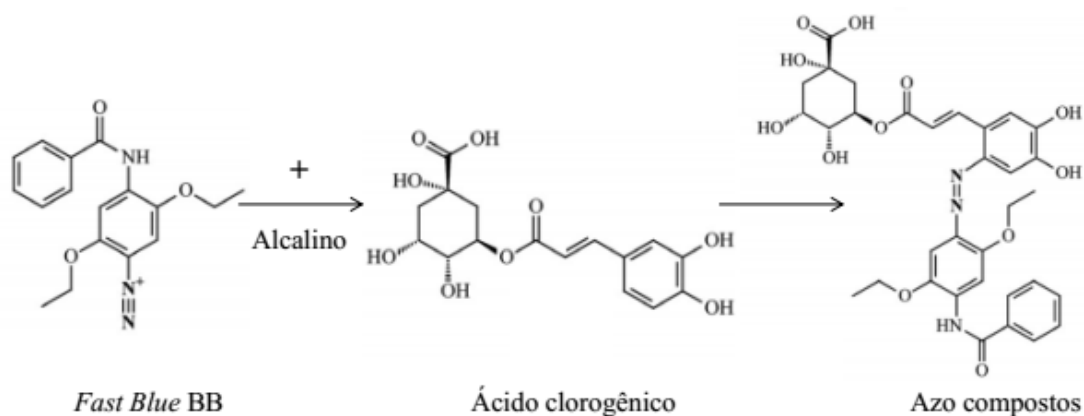
O processo de ultrassom mostrou maior quantidade ( $p \leq 0,05$ ) de compostos fenólicos em extratos e amostras sólidas (*Quencher*) orgânicas (803,34 a 7076,43 mgEAG/100 g) e convencionas (763,01 a 6366,30 mgEAG/100 g) comparado ao processo de agitação convencional *shaker*. A atividade antioxidante pelo ensaio *in vitro*

de FRAP também foi maior para os extratos e amostras sólidas de goji berry orgânica (11,45 a 234,11 mmolTE/100 g) e convencional (10,27 a 117,12 mmolTE/100 g) obtidos por ultrassom. Estes resultados podem ser explicados pelo fenômeno chamado cavitação que ocorre no processo de ultrassom, ou seja, produção, crescimento e colapso de bolhas. As cavitações produzem forças de cisalhamento que perturbam mecanicamente as paredes celulares dos vegetais e aumentam os processos de transferência de massa (REZAIE *et al.*, 2015). Com isso, a lixiviação de compostos orgânicos e inorgânicos a partir da matriz vegetal é intensificada.

Como mostrado na **Tabela 10**, o método de Folin-Ciocalteu apresentou para extratos e amostras sólidas de goji berry maiores ( $p \leq 0,05$ ) conteúdos de fenólicos (912,42 a 6350,54 mg/100 g), quando comparado com *Fast Blue* BB (712,88 a 7076,43 mg/100 g). Os métodos de determinação empregados envolvem diferentes mecanismos de reação química e isso pode ter influenciado fortemente nos resultados observados.

O Folin-Ciocalteu é um reagente oxidante a base dos ácidos fosfomolibidênico e fosfotungístico, que na presença de antioxidantes é reduzido e formam-se os complexos molibdênio-tungstênio  $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$  de coloração azul. A análise detecta a presença de uma ampla variedade de compostos, como fenóis, agentes redutores e possíveis quelantes de metais (SINGLETON, ORTHOFER, LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Entretanto, alguns destes compostos podem interferir na análise formando o complexo de coloração azul, como antioxidantes não fenólicos e substâncias redutoras (ácido ascórbico, glicose, frutose e sulfitos), aminoácidos (tirosina, triptofano) e proteínas que contêm esses aminoácidos (PETERSON, 1979; MEDINA, 2011).

O método de *Fast Blue* baseia-se na interação direta entre fenólicos com o sal de diazônio (reagente *Fast Blue* BB). Portanto, o ácido ascórbico e outros compostos redutores que podem interferir na análise não reagem com o sal de diazônio. Este sal contém um grupo diazônio ( $-\text{N}=\text{N}-$ ), onde em meio alcalino o nitrogênio é retido em acoplamento com o grupo ativador reativo ( $-\text{OH}$ ) do fenólico, ocasionando uma substituição eletrofílica aromática na posição *orto* ou *para*, e formação de compostos azo (MEDINA, 2011). Este fenômeno pode ser observado na **Figura 19**, onde o ácido clorogênico, um dos principais ácidos fenólicos presentes em frutas *Lycium barbarum* L., reage com o sal de diazônio na posição *para*, para ativação do grupo  $-\text{OH}$ .



**Figura 19** Reação entre o sal de diazônio (*Fast Blue BB*) e o ácido clorogênico.

Fonte: Medina (2011).

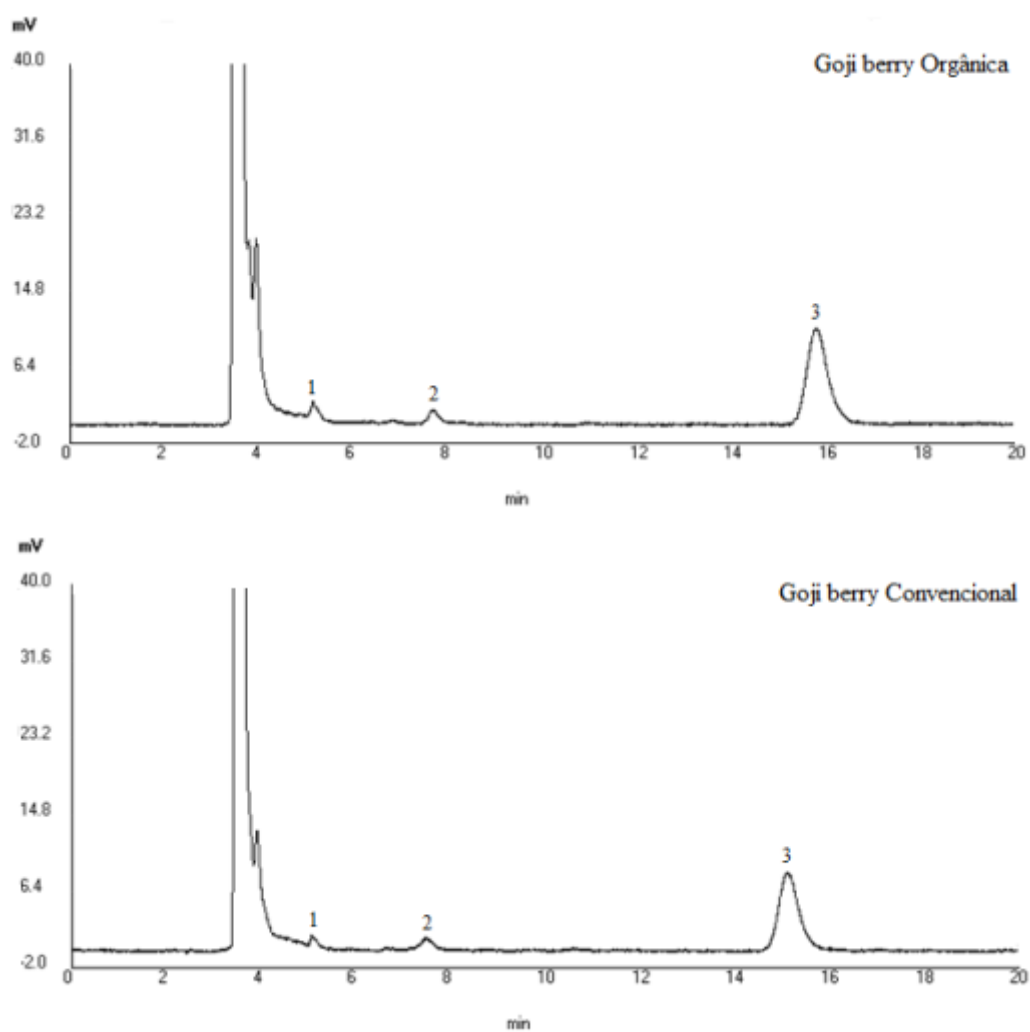
Amostras de goji berry são reportadas por apresentarem elevados conteúdos de açúcares e ácido ascórbico (YIN e DANG, 2008; ZHANG *et al.*, 2011), importantes interferentes na quantificação de compostos fenólicos totais. Com isso, pode-se dizer que o método de *Fast Blue BB* é o mais adequado para a determinação de compostos fenólicos totais, tanto em extratos quanto em amostras sólidas de frutas goji cultivadas nos sistemas, orgânico e convencional.

Houve grande variação ( $p \leq 0,05$ ) do conteúdo de fenólicos totais (Folin-Ciocalteu e *Fast Blue BB*) e da atividade antioxidante (FRAP) entre amostras sólidas (2265,95 a 7076,43 mg/100 g e 38,78 a 234,11 mmolTE/100 g) e extratos (712,88 a 1094,92 mg/100 g e 10,09 a 11,45 mmolTE/100 g) de frutas goji orgânicas e convencionais (**Tabela 10**). O conteúdo de compostos fenólicos e atividade antioxidante foram entre 3 a 20 vezes maiores em amostras sólidas (*Quencher*), comparados aos extratos. Muitos alimentos, como frutas, vegetais e cereais apresentam grande quantidade de compostos insolúveis, como fenólicos ligados. Estes compostos não são facilmente extraídos com o uso de solventes químicos e, portanto não são quantificados. Métodos alternativos podem ser utilizados, como *Quencher*, um teste rápido e direto, o qual permite a determinação de compostos insolúveis na matriz vegetal sólida (CONDEZO-HOYOS *et al.*, 2015). Portanto, os maiores conteúdos de fenólicos totais obtidos para amostras sólidas (*Quencher*), podem estar relacionados aos fenólicos ligados a matriz vegetal. Além disso, carotenoides e ácido ascórbico, reportados na literatura como antioxidantes presentes em altas concentrações em frutas goji, podem ter contribuído fortemente para a elevada atividade antioxidante (HEMPEL *et al.*, 2017).

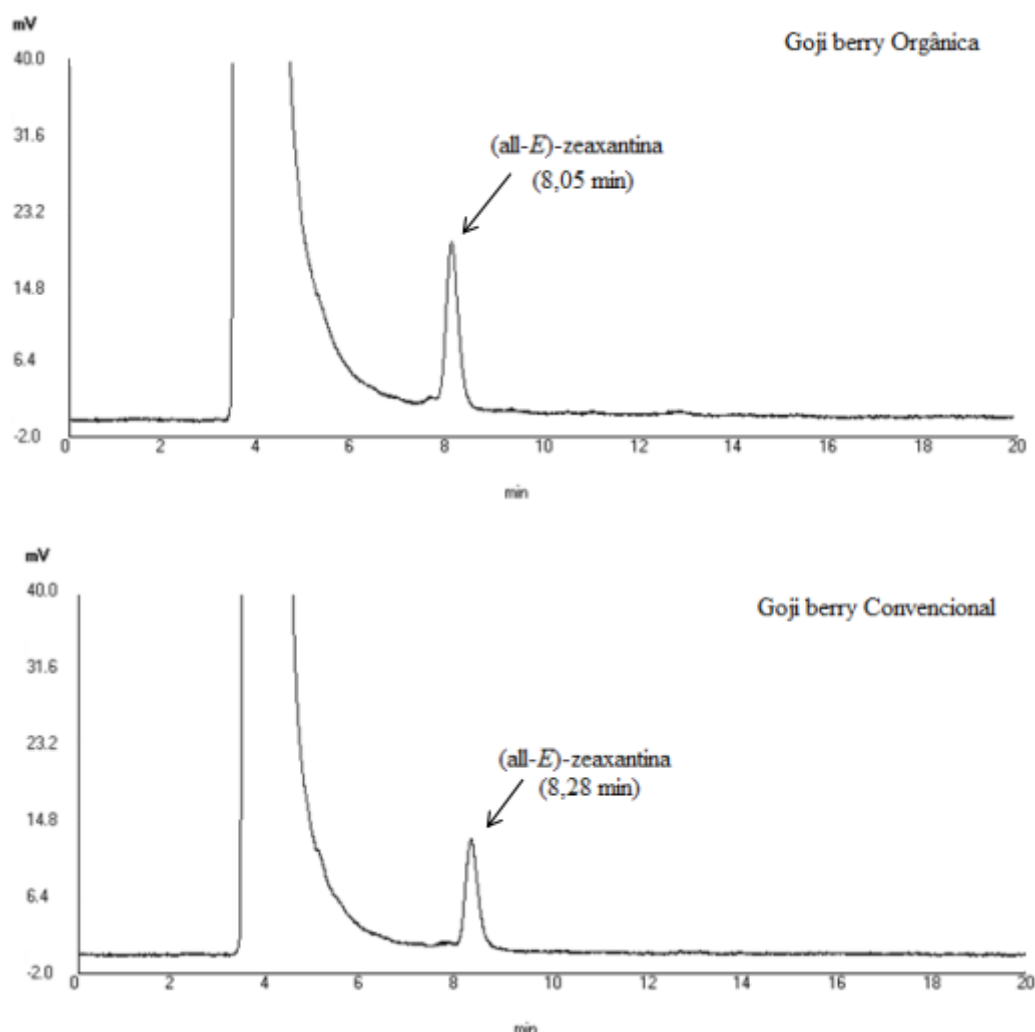
Extratos e amostras sólidas (*Quencher*) de goji berry orgânica apresentaram maiores ( $p \leq 0,05$ , *t-student*) conteúdos de fenólicos totais (740,34 a 7076,43 mg/100 g) e atividade antioxidante (10,72 a 234,11 mmolTE/100 g) em relação à convencional (71,88 a 6366,30 mg/100 g e 10,09 a 117,12 mmolTE/100 g), como mostrado na **Tabela 10**. Resultados explicados pela resposta da planta a situações de estresse fisiológico. Frutas orgânicas, por não utilizarem agroquímicos no seu cultivo, tendem a ser mais suscetíveis ao ataque de pragas e patógenos, e frágeis às condições climáticas adversas. Com isso, a planta tende a produzir grande quantidade de compostos de defesa, oriundos do metabolismo secundário, como compostos fenólicos (PEÑUELAS *et al.*, 2008).

### 3.2 Carotenoides

Os principais carotenoides presentes em amostras de goji berry orgânica e convencional foram identificados e quantificados por CLAE. Nos extratos insaponificados foram identificados 2 xantofilas ((*all-E*)-luteína e (*all-E*)-zeaxantina) (**Figura 20**), e no extrato saponificado foi detectado apenas a (*all-E*)-zeaxantina (**Figura 21**).



**Figura 20** Perfil cromatográfico dos extratos de carotenoides insaponificados de frutas goji orgânicas e convencionais: (1) (all-*E*)-luteína, (2) (all-*E*)-zeaxantina e (3) não identificado.



**Figura 21** Perfil cromatográfico dos extratos de carotenoides saponificados de frutas goji orgânicas e convencionais.

Como observado nas **Figuras 20 e 21**, o processo de saponificação ocasionou em um maior conteúdo de (all-*E*)-zeaxantina e uma possível degradação da luteína e de outro composto não identificado (picos 1 e 3, respectivamente) nas amostras, pois este processo envolve uma reação química exotérmica. Segundo Zhao *et al.* (2013) a zeaxantina presente na goji berry está disponível como éster e pode ser convertida em zeaxantina livre através do processo químico de saponificação. Além disso, compostos como, clorofila, lipídeos e impurezas podem ser removidos através deste processo, diminuindo interferentes na análise.

A **Tabela 11** mostra o conteúdo dos carotenoides identificados em amostras orgânicas e convencionais de goji berry. Extratos de carotenoides insaponificados de frutas goji apresentaram conteúdos de (all-*E*)-luteína e (all-*E*)-zeaxantina variando de 0,13 a 0,16 e 0,24 a 0,28 mg/100g, respectivamente. Extratos saponificados



apresentaram apenas a (all-*E*)-zeaxantina como carotenoide, com teores de 8,36 e 6,61 mg/100 g para frutas orgânicas e convencionais, respectivamente. Zhao *et al.* (2017) observaram uma elevada redução do conteúdo de luteína em extratos de goji berry após o processo de saponificação, e relacionaram com um possível processo de degradação da molécula.

**Tabela 11** Conteúdo de carotenoides insaponificados e saponificados em frutas goji orgânica e convencional.

Carotenoides <sup>1</sup> (mg/100g)	Tempo de retenção (min)	Orgânica	Tempo de retenção (min)	Convencional
Insaponificado				
(all- <i>E</i> )-luteína	5,30	0,16 ± 0,02 <sup>Ac</sup>	5,42	0,13 ± 0,03 <sup>Ac</sup>
(all- <i>E</i> )-zeaxantina	7,62	0,28 ± 0,04 <sup>Ab</sup>	7,69	0,24 ± 0,06 <sup>Ab</sup>
Saponificado				
(all- <i>E</i> )-zeaxantina	8,28	8,36 ± 0,15 <sup>Aa</sup>	8,05	6,61 ± 0,03 <sup>Ba</sup>

<sup>1</sup>Valores expressos como médias e desvio padrão ( $n = 3$ ). Em cada linha, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*). Em cada coluna, diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

No estudo realizado por Wong *et al.* (2013) o conteúdo de luteína e zeaxantina em amostras de goji berry variou de 0,14 a 0,68 e 0,23 a 0,47 mg/100 g, respectivamente. Zhao *et al.* (2017) determinaram em diferentes amostras de goji berry teores de 0,33 a 1,87 e 6,49 a 152,29 mg/100 g de luteína e zeaxantina, respectivamente. O conteúdo de carotenoides no extrato insaponificado não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ , *t-student*) entre amostras orgânicas e convencionais (**Tabela 11**). Entretanto, para o extrato saponificado, frutas orgânicas mostraram maior conteúdo de (all-*E*)-zeaxantina.

Diferenças observadas no conteúdo de carotenoides podem ser explicadas por diferentes fatores que interferem na produção destes compostos, como variedade, condições de armazenamento, sistemas de cultivo, temperatura e principalmente exposição à luz (BORGUINI *et al.*, 2013). Carotenoides apresentam grupos cromóforos na molécula, os quais são responsáveis pela absorção da luz solar e transformação em energia química.

Na literatura, diferentes autores também identificaram a zeaxantina (~ 80%) como o carotenoide majoritário em amostras de goji berry de diferentes espécies (INBARAJ *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2014; HEMPEL *et al.*, 2017). O estudo realizado por Zhao *et al.* (2017) mostrou que amostras de goji berry colhidas em diferentes localidades

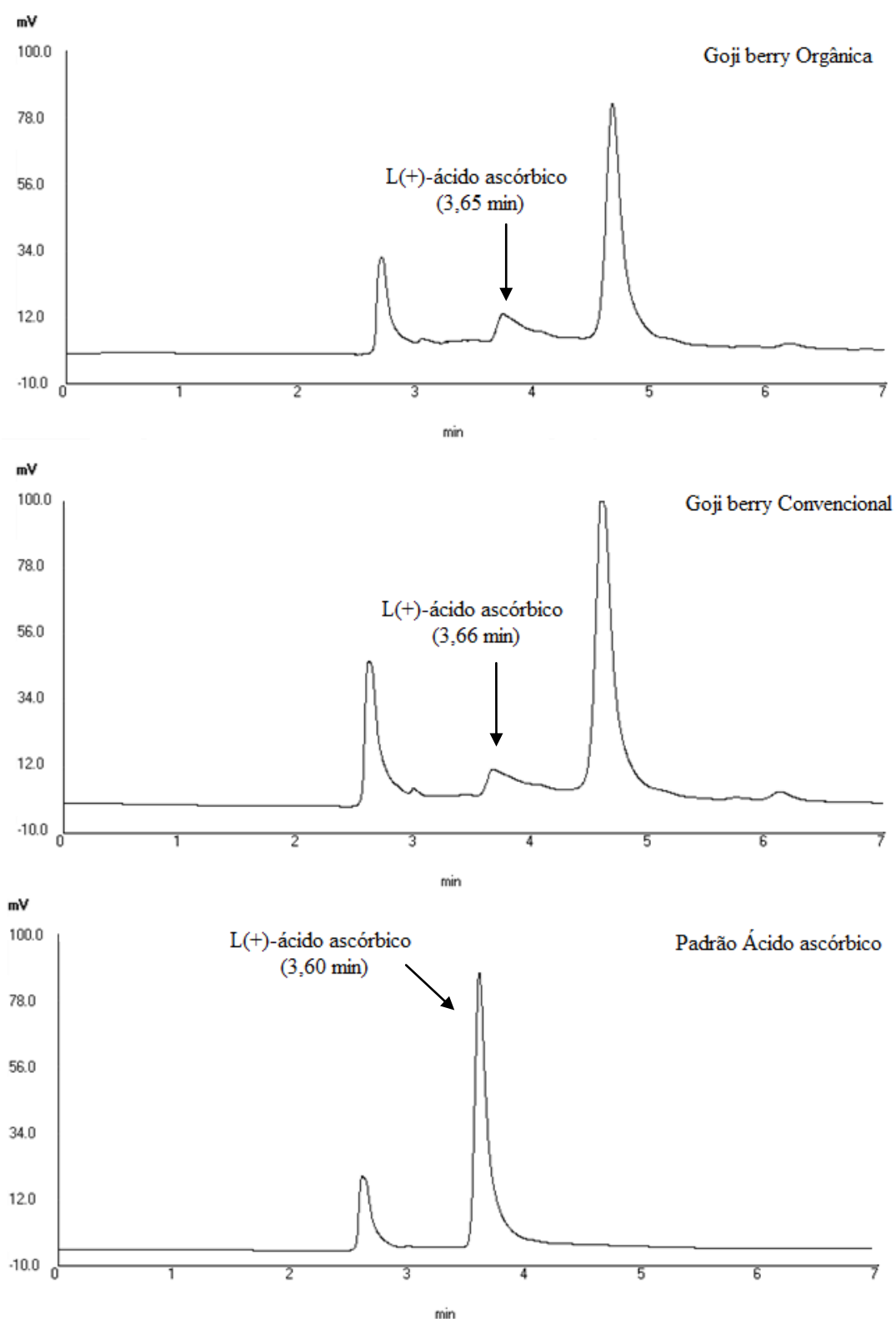
apresentaram 60 a 70 vezes mais zeaxantina que outros alimentos fontes de zeaxantina, como a gema de ovo. Portanto, a goji berry pode ser considerada uma excelente fonte deste carotenoide.

A zeaxantina é um potente antioxidante que age principalmente na proteção contra degenerações oculares (SNODDERLY, 1995). Este pigmento é também utilizado como aditivo alimentar com o objetivo de aumentar a coloração da gema de ovo de aves, e em suínos e peixes para a pigmentação do tecido epitelial (NELIS e DELEENHEER, 1991). Além disso, estudos demonstram que a zeaxantina tem efeitos na prevenção de alguns tipos de câncer e pode diminuir o processo de progressão da aterosclerose (CARPENTER *et al.*, 1997; NISHINO *et al.*, 1999).

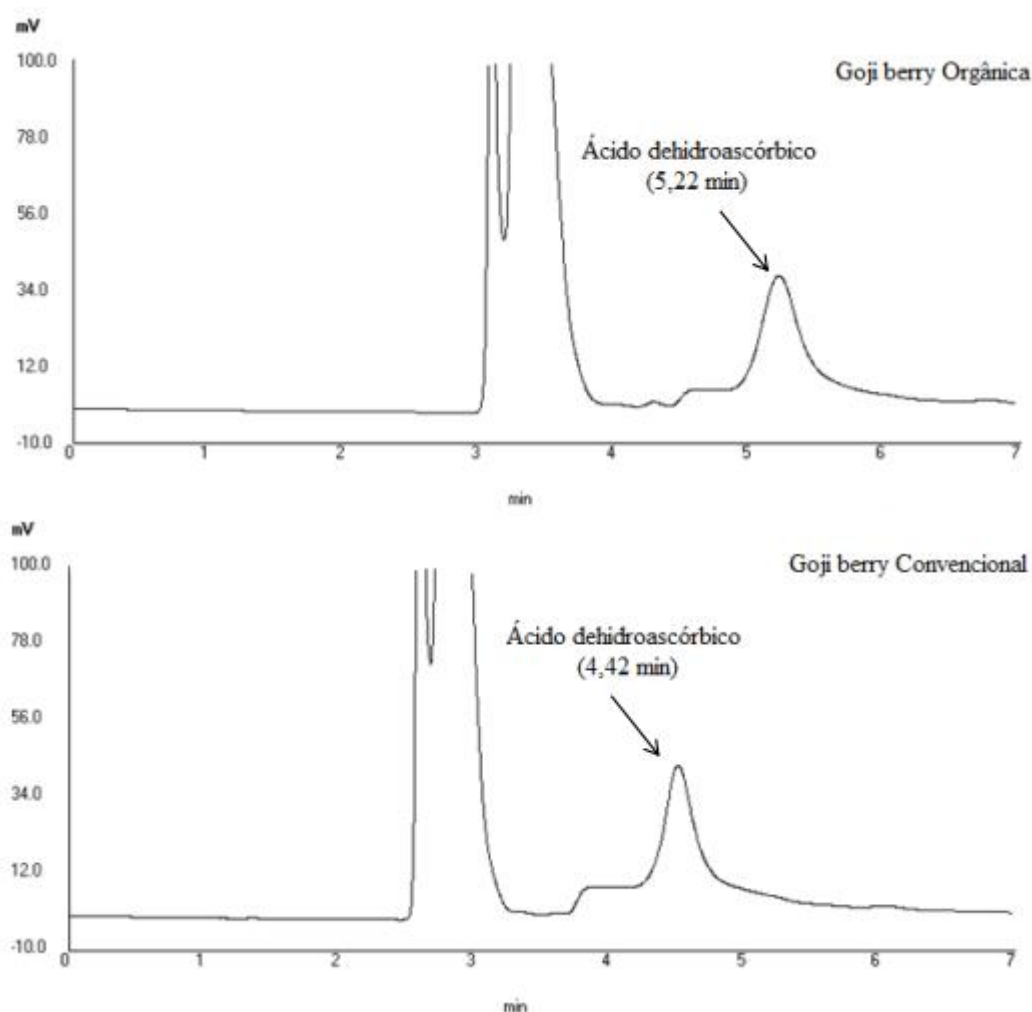
### 3.3 Ácido ascórbico e dehidroascórbico: Vitamina C

A vitamina C é amplamente distribuída em produtos de origem vegetal, e pode ser encontrada na forma reduzida (ácido L-ascórbico) ou oxidada (ácido L-dehidroascórbico), embora a forma reduzida ocorra mais naturalmente em fontes vegetais. A oxidação da molécula de L-ácido ascórbico a converte em ácido L-dehidroascórbico através de um processo reversível de transferência de elétrons (DAMODARAN, PARKIN e FENNEMA, 2010).

As formas reduzida e oxidada da vitamina C foram identificadas e quantificadas em amostras de goji berry cultivadas no sistema orgânico e convencional por CLAE-IR. A **Figura 22** mostra o cromatograma do L-ácido ascórbico com tempos de retenção para frutas orgânicas e convencionais de 3,65 e 3,66 min, respectivamente. Após o processo oxidativo dos extratos de goji berry, o L-ácido ascórbico foi convertido em ácido L-dehidroascórbico. Os cromatogramas foram obtidos (**Figura 23**), e mostraram tempos de retenção de 5,22 e 4,42 min para amostras orgânicas e convencionais, respectivamente.



**Figura 22** Cromatogramas do ácido L-ascórbico obtido de amostras de goji berry orgânica e convencional comparados com o padrão ácido ascórbico.



**Figura 23** Cromatogramas do ácido L-dehidroascórbico obtido de amostras de goji berry orgânica e convencional.

A **Tabela 12** mostra os conteúdos da vitamina C (ácido ascórbico total) e das duas formas encontradas em frutas goji orgânicas e convencionais. Frutas orgânicas apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o conteúdo total de ácido ascórbico, L-ácido ascórbico e L-ácido dehidroascórbico (101,83, 34,88 e 66,95 mg/100 g, respectivamente). Enquanto que frutas convencionais não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as duas formas de ácido ascórbico presentes (40,87 e 39,60 mg/100 g). Pode-se dizer que os conteúdos de ácido ascórbico total (vitamina C) das amostras de goji berry do presente estudo (101,83 e 80,46 mg/100 g) foram superiores a outras frutas fontes de vitamina C, como laranja, morango e *kiwi* (71,12, 57,95 e 74,56 mg/100 g, respectivamente) (DONNO *et al.*, 2014).

**Tabela 12** Conteúdo de ácido ascórbico em frutas goji orgânica e convencional.

Ácido ascórbico <sup>1</sup> (mg/100 g)	Goji berry	
	Orgânica	Convencional
Ácido ascórbico total	101,83 ± 2,24 <sup>Aa</sup>	80,46 ± 1,85 <sup>Ba</sup>
L-ácido ascórbico	34,88 ± 1,99 <sup>Bc</sup>	40,87 ± 1,34 <sup>Ab</sup>
L-ácido dehidroascórbico	66,95 ± 4,24 <sup>Ab</sup>	39,60 ± 0,52 <sup>Bb</sup>

<sup>1</sup>Valores expressos como médias e desvio padrão ( $n = 3$ ). Em cada linha, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*). Em cada coluna, diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

Os conteúdos de ácido ascórbico total e da forma oxidada, L-ácido dehidroascórbico, foram significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ) em frutas orgânicas quando comparadas com frutas cultivadas no sistema convencional. Resultados semelhantes foram obtidos por Pertuzatti *et al.* (2015), os quais compararam o conteúdo de compostos fitoquímicos em amostras de maracujá (*Passiflora edulis*) cultivadas no sistema orgânico e convencional. Segundo Genovese *et al.* (2008) os teores de vitamina C em frutas estão sujeitos a uma ampla variedade de fatores ambientais, dentre eles, luz, temperatura, sais, e a presença de poluentes atmosféricos, metais e agrotóxicos.

### 3.4 Atividade antimicrobiana do extrato fenólico

As concentrações mínimas inibitórias (CMI's) dos extratos fenólicos de frutas goji orgânicas e convencionais contra bactérias gram positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e gram negativas (*Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*) estão apresentados na **Tabela 13**.

**Tabela 13** Concentrações mínimas inibitórias (CMI's) obtidas para extratos fenólicos de goji berry orgânica e convencional.

Amostras	CMI (mg/mL)			
	Gram positivas		Gram negativas	
	<i>B. cereus</i> <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	<i>S. enteritidis</i> <sup>3</sup>	<i>E. coli</i> <sup>4</sup>
Amoxicilina (mg/L)	4,00	0,25	1,00	12,50
Goji orgânica	20,00	10,00	20,00	40,00
Goji convencional	40,00	40,00	80,00	40,00

<sup>1</sup>*Bacillus cereus*. <sup>2</sup>*Staphylococcus aureus*. <sup>3</sup>*Salmonella enteritidis*. <sup>4</sup>*Escherichia coli*.

O controle positivo (amoxicilina) apresentou diferentes valores de CMI para as cepas de bactérias utilizadas no presente estudo, variando de 0,25 a 12,50 mg/L. Os extratos fenólicos da goji berry orgânica e convencional mostraram atividade

antimicrobiana contra as bactérias gram positivas e gram negativas testadas, com CMI's variando de 10 a 40 e 40 a 80 mg/mL, respectivamente. O estudo realizado por Mocan *et al.* (2014) também mostrou atividade antimicrobiana (75 a > 100 mg/mL) dos extratos obtidos de folhas das espécies *Lycium barbarum* L. e *Lycium Chinese* Mill. contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*. Entretanto, conforme mostrado na **Tabela 13**, as menores CMI's (maiores atividades antimicrobianas) foram determinadas para extratos de frutas orgânicas. Estes resultados podem ser explicados pelo elevado conteúdo de compostos fenólicos com alta atividade antioxidante obtido para estas amostras (item 3.1 deste capítulo), em comparação com extratos de frutas cultivadas com agroquímicos.

A atividade antimicrobiana de compostos fenólicos está relacionada com diferentes mecanismos, como desestabilização e permeabilização da membrana celular, inibição enzimática pela ligação de grupos hidroxila de fenólicos com sítios ativos de enzimas microbianas, e bloqueio de substratos para o crescimento microbiano através do processo de quelação de metais (especialmente ferro e zinco) (CUSHNIE *et al.*, 2007).

As maiores atividades antimicrobianas dos extratos foram obtidas contra as bactérias gram positivas (**Tabela 13**). Bactérias gram negativas são mais resistentes à ação de agentes antimicrobianos, pois apresentam uma membrana celular altamente complexa, o que a torna impermeável a alguns compostos (SALEM, ALI e MANSOUR, 2014).

## CONCLUSÃO

Entre os métodos de extração de compostos fenólicos, extratos e amostras sólidas obtidas por ultrassom apresentaram maiores conteúdos de fenólicos totais e atividade antioxidante em comparação com a agitação convencional *shaker*. O método de análise mais adequado para a quantificação de fenólicos totais em amostras de goji berry orgânicas e convencionais é o *Fast Blue BB*, pois elimina possíveis interferentes, como o ácido ascórbico e açúcares, evitando uma superestimção dos resultados. Os conteúdos de fenólicos totais e atividade antioxidante foram de 3 a 20 vezes maiores em amostras sólidas (*Quencher*), comparados aos extratos. Os carotenoides (all-*E*)-luteína e (all-*E*)-zeaxantina foram identificados por CLAE, em extratos insaponificados de goji berry orgânica e convencional. Extratos saponificados apresentaram apenas (all-*E*)-zeaxantina. Os conteúdos de ácido ascórbico total e de suas formas, reduzida (L-ácido ascórbico) e oxidada (L-ácido dehidroascórbico) em frutas goji orgânicas e convencionais foram superiores aos determinados em frutas fontes de vitamina C (laranja, morango e *kiwi*). Os extratos fenólicos da goji berry orgânica e convencional mostram atividades antimicrobianas contra todas as cepas de bactérias testadas, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*. Os extratos de frutas orgânicas apresentaram maior atividade antioxidante, conteúdo de fenólicos, (all-*E*)-zeaxantina, ácido ascórbico total (vitamina C), além de elevada atividade antimicrobiana, comparados aos extratos obtidos de frutas convencionais. Portanto, extratos obtidos da goji berry cultivada no sistema orgânico podem ser importantes antioxidantes naturais aplicáveis na formulação de produtos alimentícios.

## CAPÍTULO V

---

### **Caracterização e atividade biológica dos óleos de frutas *Lycium barbarum* L. cultivadas no sistema orgânico e convencional**

#### **RESUMO**

O rendimento, perfil de ácidos graxos, carotenoides, atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos extraídos de frutas goji cultivadas no sistema orgânico e convencional foram investigados. Para isso, foram utilizados diferentes métodos de extração: Soxhlet, Maceração e Bligh & Dyer. A composição de ácidos graxos foi determinada por ressonância magnética nuclear (RMN) e a espectroscopia de Raman foi utilizada para a caracterização de carotenoides em óleos da goji berry. Os maiores rendimentos ( $p \leq 0,05$ ) foram obtidos pelo método de Soxhlet (4,58-2,83%). O método de Bligh & Dyer foi o mais eficiente para a extração de ácidos graxos insaturados (AGI) de frutas orgânicas (87,20%) e convencionais (82,53%). O ácido linoleico (C18:2n6c) foi o principal ácido graxo presente nos óleos de goji berry. A zeaxantina foi o principal carotenoide presente nos óleos de goji berry e o método de Maceração demonstrou maior conteúdo de carotenoides. Óleos obtidos pelo método de Maceração também mostraram maior atividade antioxidante (2,23 a 40,94 mmolTE/100 g) e antimicrobiana (3,12 a 200 mg/mL). Os óleos extraídos da goji berry cultivada no sistema orgânico apresentaram elevados valores de rendimento, AGI, carotenoides e atividade antioxidante e antimicrobiana em comparação com os óleos obtidos de frutas cultivadas de forma convencional. Estes resultados indicam que os óleos extraídos de frutas goji orgânicas, além de serem seguros, são componentes especiais para aplicações na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia.

**Palavras-chave:** óleo orgânico, ácidos graxos, Raman, RMN.

#### **1 INTRODUÇÃO**

A fruta *Lycium barbarum* L. (conhecida como goji berry, *wolfberry* ou "gou-qi-zi") pertence à família Solanaceae e é usada por mais de 2000 anos na medicina tradicional chinesa (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011). Estudos indicam que extratos de frutas goji são importantes no envelhecimento, neuroproteção, imunomodulação, aumento do metabolismo, controle dos níveis de glicose, atividade antioxidante e antitumoral, e citoproteção. Os efeitos biológicos dos extratos e dos óleos de fontes naturais estão diretamente relacionados aos compostos antioxidantes presentes na matriz vegetal (AMAGASE e FARNSWORTH, 2011).



Recentemente, o óleo da goji berry tem sido amplamente utilizado na formulação de produtos na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. O óleo desta fruta é rico em ácido linoleico ( $\omega$ -6), um ácido graxo poliinsaturado que desempenha papel importante na regulação das atividades fisiológicas e biológicas do organismo (SÁNCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2016). A composição dos ácidos graxos é um fator determinante no uso industrial do óleo vegetal e é altamente influenciada pelas condições climáticas e práticas de cultivo (SÁNCHEZ-SALCEDO *et al.*, 2016). Além disso, o método e o solvente empregados na extração de compostos de fontes naturais devem ser levados em consideração.

A ressonância magnética nuclear (RMN) tem sido uma ferramenta promissora e prática para a identificação de ácidos graxos, pois é uma técnica rápida e não destrutiva que requer pequena quantidade de amostra (MARCONE *et al.*, 2013). Os carotenoides também são encontrados em grande quantidade em óleos de goji berry e apresentam elevado potencial antioxidante e antimicrobiano (ERNAWITA *et al.*, 2016). Estes pigmentos absorvem luz nas regiões ultravioleta e visível, e a espectroscopia de Raman pode avaliar rapidamente esses compostos (BHOSALE *et al.*, 2004).

Algumas plantas utilizadas em formulações fitoterápicas e alimentares necessitam de um maior controle, pois muitas podem apresentar substâncias tóxicas, como os agroquímicos utilizados na sua produção (GALHIANE *et al.*, 2006). Por esse motivo, muitos países asiáticos têm dado importância à produção orgânica da goji berry. A agricultura orgânica produz alimentos isentos de resíduos químicos, reduzindo danos ambientais e favorecendo a criação de novas oportunidades para pequenos produtores (MACORIS *et al.*, 2012).

Na literatura, poucos estudos relacionados ao óleo da goji berry foram encontrados e nenhuma pesquisa foi feita para comparar os ácidos graxos, carotenoides, atividade antioxidante e antimicrobiana de frutas goji cultivadas no sistema orgânico e convencional. A fim de fornecer diretrizes para o uso inovador deste produto pela indústria de alimentos, cosméticos e medicamentos, os principais objetivos deste estudo foram avaliar a influência dos diferentes métodos de extração: Soxhlet, Maceração e Bligh & Dyer no rendimento, na composição de ácidos graxos (RMN) e caracterização de carotenoides (espectroscopia Raman) e, atividade antioxidante e antimicrobiana de óleos de frutas goji orgânicas e convencionais.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAIS

#### 2.1.1 Reagentes

Os reagentes TPTZ, DPPH, ABTS, clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e o padrão Trolox (pureza  $\geq 95\%$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Os solventes, hexano ( $\text{C}_6\text{H}_{14}$ ), clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$ ) e éter etílico ( $\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$ ) foram adquiridos da Vetec® (Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), dimetilsufóxido (DMSO) e cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP, Brazil). Os demais reagentes foram de grau analítico e a água ultrapura foi obtida por um sistema de água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

#### 2.1.2 Amostra

Conforme descrito anteriormente no item 2.1.2 do Capítulo II.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Procedimentos de extração

Diferentes métodos de extração foram utilizados para obtenção de óleos das amostras de goji berry orgânica e convencional: Soxhlet, Maceração e Bligh & Dyer.

##### 2.2.1.1 Soxhlet

Conforme descrito anteriormente no item 2.2.5 do Capítulo II.

##### 2.2.1.2 Maceração

A fração lipídica foi extraída de acordo com o método estabelecido por Chung *et al.* (2011). Vinte gramas de goji berry e 100 mL de éter etílico foram introduzidas em um balão de fundo chato. O balão foi selado e a mistura foi armazenada no escuro a  $25 \pm 2$  °C durante 24 h. A mistura foi filtrada (Whatman 1001110) e o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo (Fisatom 802, São Paulo, SP, Brasil) sob pressão reduzida a  $50 \pm 2$  °C. O solvente residual foi evaporado em uma estufa com circulação forçada de ar a  $50 \pm 2$  °C durante 1 h e calculou-se o rendimento. Os óleos foram

transferidos para frascos âmbar, mantidos sob atmosfera de nitrogênio, selados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises.

### 2.2.1.3 Bligh & Dyer

Os lipídios foram extraídos das amostras de goji berry de acordo com o método proposto por Bligh e Dyer (1959). Três gramas das amostras foram misturadas com clorofórmio/água/metanol (20/10/8, v/v/v) e homogeneizadas em um agitador *shaker* (Marconi MA 420, São Paulo, SP, Brasil) a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 200 rpm durante 30 min. Em seguida, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de sulfato de sódio 1,5% (m/v). A mistura foi agitada durante 5 min e decantada, com formação de um sistema bifásico. A fase inferior (clorofórmio) foi recolhida em tubos *falcon* contendo 1 g de sulfato de sódio anidro, e em seguida agitada e filtrada (Whatman 1001110). Os óleos foram combinados e o solvente evaporado em um evaporador rotativo (Fisatom 802, São Paulo, SP) sob pressão reduzida a  $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . O solvente residual foi evaporado em uma estufa com circulação forçada de ar a  $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 1 h e calculou-se o rendimento. Os óleos foram transferidos para frascos âmbar, mantidos sob atmosfera de nitrogênio, selados e armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises.

### 2.2.2 Ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizadas no Centro de RMN, Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR). Aproximadamente 5 mg de cada amostra de óleo foram transferidos para tubos de RMN de 5 mm e o volume completado para 600  $\mu\text{L}$  com clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) contendo 0,05% (v/v) de tetrametilsilano (TMS). A composição de ácidos graxos foi determinada como descrito por Barison *et al.* (2010) por espectroscopia de RMN (Bruker AVANCE III, Billerica, Massachusetts, EUA), operando a 14,1 Tesla,  $^1\text{H}$  a 600,13 MHz. O espectrômetro foi equipado com uma sonda de quatro canais de detecção inversa de 5 mm com gradiente em z. Os espectros quantitativos de RMN foram adquiridos com 64 K pontos de dados de domínio do tempo distribuídos em uma largura espectral de 12019 Hz, proporcionando uma resolução espectral de 0,37 Hz, atraso de reciclagem de 18 s, tempo de aquisição de 2,72 s e 8 varreduras. Os espectros de RMN foram processados aplicando uma multiplicação exponencial das FID por um

fator de 0,3 Hz antes da transformada de Fourier e preenchimento 0 a 128 K. A correção de fase de zero e primeira ordem foi efetuada manualmente. As deslocamentos químicos de RMN foram expressas em ppm em relação ao sinal de TMS a 0,00 ppm como referência interna.

### **2.2.3 Espectroscopia de Raman**

Os espectros Raman foram obtidos através de um Microscópio Confocal Raman (Witec alfa 300R, Ulm - Alemanha), no Centro de microscopia eletrônica (CME) da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As medidas foram realizadas com 500 varreduras e um raio laser não focado de 300 mW com diâmetro de cerca de 1 mm. A resolução espectral de  $3\text{ cm}^{-1}$  no intervalo de 200 a  $4000\text{ cm}^{-1}$  foi utilizada para todos os espectros.

### **2.2.4 Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante dos óleos da goji berry foi determinada por ensaios *in vitro* (FRAP, ABTS e DPPH). As curvas padrão para todos os ensaios foram preparadas com Trolox e os resultados expressos em milimol equivalentes de Trolox por 100 g de amostra seca (mmolTE/100 g). Para determinação, diluiu-se 0,5 g de amostra em 950  $\mu\text{L}$  de acetato de etila de acordo com a metodologia proposta por Malacrida, Kimura e Jorge (2012). Em seguida, as amostras foram diluídas 1/40 (v/v) em acetato de etila.

Os ensaios *in vitro* de FRAP, ABTS e DPPH foram realizados como conforme descrito anteriormente no item 2.2.7 do Capítulo III.

### **2.2.5 Atividade antimicrobiana**

A determinação da atividade antimicrobiana de óleos extraídos de amostras de goji berry foi realizada no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

#### **2.2.5.1 Cepas microbianas**

Conforme descrito anteriormente no item 2.2.5.1 do Capítulo IV.

### 2.2.5.2 Preparação da suspensão bacteriana

Conforme descrito anteriormente no item 2.2.5.2 do Capítulo IV.

### 2.2.5.3 Microdiluição

A atividade antimicrobiana foi determinada através da concentração mínima inibitória (CMI) usando o método da microdiluição (WIEGAND, HILPERT e HANCOCK, 2008) em microplacas (96 poços). Os óleos das amostras de goji berry foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluições em microplacas (200 a 0,39 mg/mL) foram realizadas em seguida. O inóculo foi adicionado aos poços e as microplacas foram incubadas a 37 °C durante 24 h. A amoxicilina a 64 mg/L e o DMSO foram utilizados como controles. A atividade antimicrobiana foi detectada pela adição de 20 µL de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) 0,5% (m/v). A CMI foi definida como a menor concentração de óleo necessária para impedir o crescimento microbiano.

### 2.2.6 Análise estatística

Os dados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) e avaliados usando o teste de normalidade Anderson-Darling. A homogeneidade de variâncias foi avaliada pelo teste de Brown-Forsythe (Action Software versão 2.5, Estatcamp, Campinas, Brasil). A análise de variância (ANOVA) foi realizada para determinar diferenças significativas entre diferentes métodos de extração. O teste de Fisher LSD foi utilizado para comparar resultados com diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). O teste *t-student* foi utilizado para avaliar os dados entre a goji berry orgânica e convencional, e os valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica 7.0 (StatSoft Inc., América do Sul, Tulsa, EUA).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Avaliação dos rendimentos

A **Tabela 14** mostra os rendimentos dos óleos extraídos da goji berry orgânica e convencional através de diferentes métodos: Soxhlet, Maceração e Bligh & Dyer. Foram observadas diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA) entre todos os métodos

de extração. O rendimento descreceu na seguinte ordem: Soxhlet > Maceração > Bligh & Dyer.

**Tabela 14** Rendimentos dos óleos extraídos da goji berry orgânica e convencional por diferentes métodos.

Método	Rendimento <sup>1</sup> (%)	
	Orgânica	Convencional
Soxhlet	4,58 ± 0,60 <sup>Aa</sup>	2,83 ± 0,51 <sup>Ba</sup>
Maceração	2,28 ± 0,20 <sup>Ab</sup>	1,81 ± 0,03 <sup>Bb</sup>
Bligh & Dyer	1,38 ± 0,18 <sup>Ac</sup>	0,97 ± 0,07 <sup>Bc</sup>

<sup>1</sup>Valores expressos como porcentagem média ± desvio padrão ( $n = 3$ ). Em cada linha, diferentes letras maiúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , *t-student*). Em cada coluna, diferentes letras minúsculas indicam diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , ANOVA).

O método de Soxhlet mostrou maior rendimento para o óleo orgânico e convencional, 4,58 e 2,83%, respectivamente. O método de Soxhlet (1879) é o mais utilizado para a extração de lipídeos de diferentes fontes naturais, devido ao alto rendimento obtido (AZMIR *et al.*, 2013). Estes resultados podem ser explicados principalmente pela alta temperatura (~ 60 °C) utilizada neste método. O aquecimento do sistema afeta o fluxo do solvente através da amostra, causando um maior contato amostra-solvente. Além disso, as altas temperaturas causam a ruptura da parede celular do vegetal, aumentando a eficiência da extração (LESCANO *et al.*, 2015).

Ao contrário do Soxhlet, os métodos de Maceração e Bligh & Dyer não utilizam altas temperaturas e o fluxo do solvente é constante. Esses fatores podem explicar o baixo rendimento dos óleos obtidos por Maceração (2,28 e 1,81%) e Bligh & Dyer (1,38 e 0,97%). O método de Bligh & Dyer apresentou o menor rendimento para os óleos orgânico e convencional. Este método possui uma mistura de solventes (clorofórmio/água/metanol) e as três fases formadas tornam-se altamente seletivas por substâncias lipídicas (BREIL *et al.*, 2017). Além disso, de acordo com Caprioli *et al.* (2016), a lavagem subsequente da mistura com água favorece a eliminação de substâncias polares não lipídicas, reduzindo o rendimento de extração.

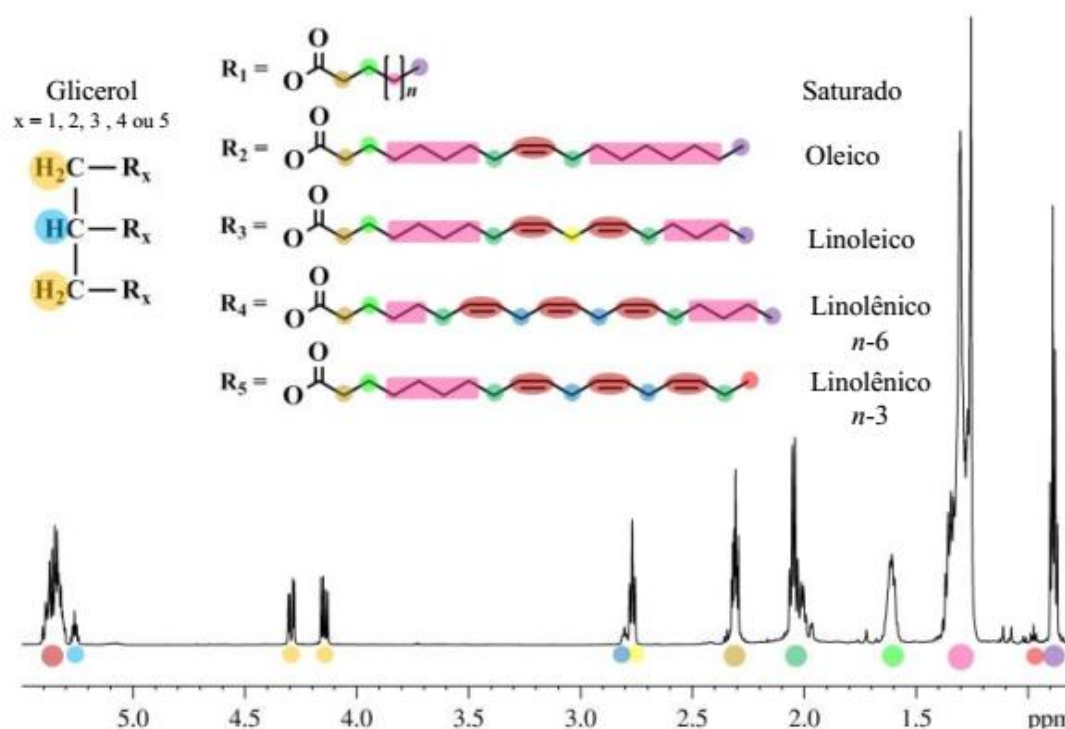
O conteúdo lipídico do presente estudo pode ser considerado elevado quando comparado à literatura. Dados da USDA (2016) e Blasi *et al.* (2016) mostram um teor de lipídeos de 0,39 e 0,48% para óleos de goji berry, respectivamente. Enquanto que o cultivo orgânico desta fruta apresentou um teor de 3,33% de lipídios, de acordo com a USDA (2017). Estes resultados mostram que o método de extração influencia

fortemente no conteúdo total de lipídeos. O rendimento da extração de compostos lipídicos depende das interações intermoleculares, seletividade e polaridade do solvente, além da temperatura e do tempo utilizados na extração (AZMIR *et al.*, 2013; REZAIE *et al.*, 2015).

As diferenças também podem ser atribuídas ao método de cultivo, período de colheita e região de produção (AZMIR *et al.*, 2013). Conforme mostrado na **Tabela 14**, o rendimento dos óleos de frutas goji apresentou diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ , teste *t-student*) entre sistemas de cultivo (orgânico e convencional) para todos os métodos de extração. Os óleos de frutas orgânicas obtiveram maiores rendimentos em relação aos óleos de frutas convencionais. Isso pode ser explicado pela resposta da planta às situações de estresse fisiológico. Plantas orgânicas são mais suscetíveis ao ataque de pragas e patógenos e são frágeis a condições climáticas adversas. Com isso, a planta tende a produzir uma grande quantidade de compostos de defesa, influenciando o rendimento de extração (MACORIS *et al.*, 2012).

### 3.2 Perfil de ácidos graxos por RMN

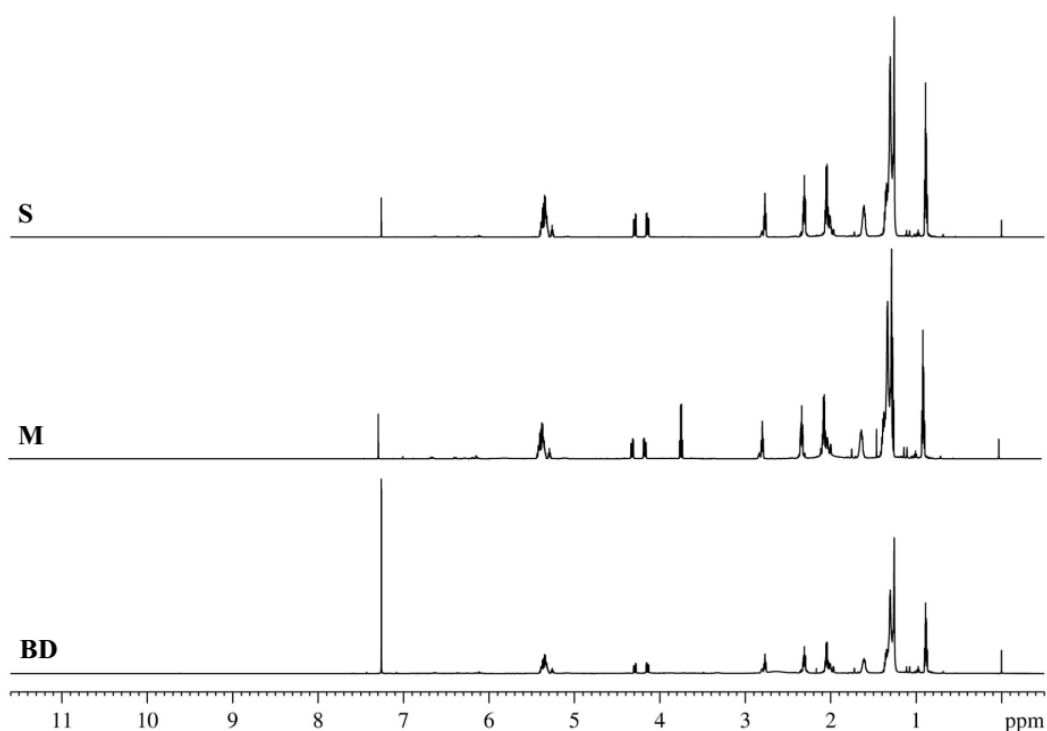
Neste estudo, foi implementada uma metodologia com base no fato de que todas as cadeias de ácidos graxos são esterificadas a uma porção de glicerol formando triglicerídeos (BARISON *et al.*, 2010). Cada parte da cadeia de ácidos graxos apresenta sinais específicos nos espectros de RMN e estão bem estabelecidos na literatura, como mostrado na **Figura 24**. A área de sinal nos espectros de RMN é diretamente proporcional ao número de núcleos de hidrogênio correspondentes na amostra, portanto a composição de ácidos graxos pode ser determinada pela relação entre as áreas de sinais característicos de cada cadeia de ácido graxo e as do esqueleto de glicerol nos espectros de RMN (BARISON *et al.*, 2010).



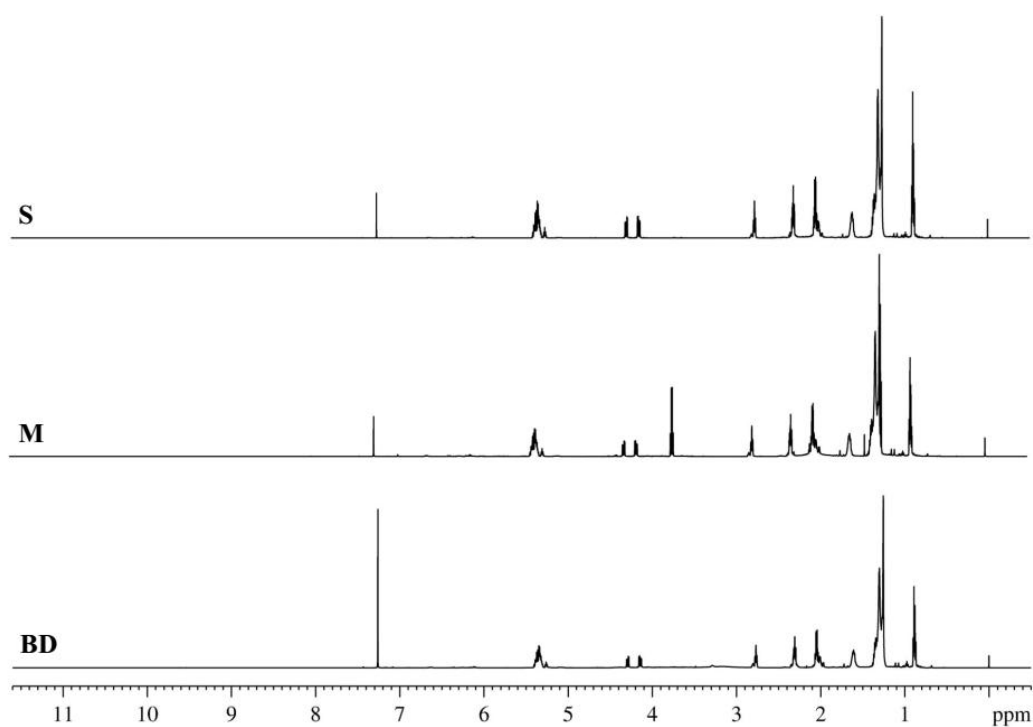
**Figura 24** Perfil espectral representativo (RMN) de uma amostra de óleo de goji berry com a respectiva atribuição dos sinais da unidade de glicerol e as cadeias de ácidos graxos.

A ausência de sinais próximos de 11,50 ppm nos espectros de RMN, característicos dos ácidos carboxílicos, indica a ausência de ácidos graxos livres (mono e dissacarídeos) em uma concentração detectável para RMN (**Figuras 25 e 26**). Estes compostos, quando detectados nas amostras podem interferir a composição de ácidos graxos. Portanto, a metodologia utilizada neste estudo pode ser aplicada às amostras de óleo extraídas de frutas goji orgânicas e convencionais, uma vez que não foram observadas quantidades significativas de mono e diglicerídeos. Além disso, o uso de um espectrômetro de alta resolução (600 MHz) permitiu a distinção entre cadeias de ácidos graxos linolênicos *n*-3 e *n*-6.





**Figura 25** Espectro de RMN do óleo extraído da goji berry convencional por Soxhlet (S), Maceração (M) e Bligh & Dyer (BD).



**Figura 26** Espectro de RMN do óleo extraído da goji berry orgânica por Soxhlet (S), Maceração (M) e Bligh & Dyer (BD).

A **Tabela 15** mostra a porcentagem de ácidos graxos (oleico, linoleico e linolênico), ácidos graxos saturados (AGS) e insaturados (AGI) totais de óleos extraídos de frutas goji (orgânica e convencional) com diferentes métodos.

**Tabela 15** Composição de ácidos graxos de óleos de frutas goji (orgânica e convencional) como % (p/p) obtidos com diferentes métodos.

Ácidos graxos (%)	Soxhlet <sup>1</sup>		Maceração <sup>2</sup>		Bligh & Dyer <sup>3</sup>	
	SO	SC	MO	MC	BO	BC
C18:1n9c <sup>4</sup>	18,15	16,02	19,26	10,69	21,34	15,40
C18:2n6c <sup>5</sup>	59,00	54,20	56,31	57,26	61,87	59,65
C18:3n3 <sup>6</sup>	1,35	1,79	2,72	2,79	1,51	5,20
C18:3n6 <sup>7</sup>	0,38	1,96	1,09	3,07	2,48	2,28
AGS <sup>8</sup>	21,12	26,03	20,62	26,19	12,80	17,47
AGI <sup>9</sup>	78,88	73,97	79,38	73,81	87,20	82,53

<sup>1</sup>SO e SC – óleo orgânico e convencional obtidos por Soxhlet. <sup>2</sup>MO e MC – óleo orgânico e convencional obtidos por Maceração. <sup>3</sup>BO e BC – óleo orgânico e convencional obtidos por Bligh & Dyer. <sup>4</sup>Ácido oleico. <sup>5</sup>Ácido linoleico. <sup>6</sup>Ácido linolênico *n*-3. <sup>7</sup>Ácido linolênico *n*-6. <sup>8</sup>Ácidos graxos saturados. <sup>9</sup>Ácidos graxos insaturados.

O ácido linoleico (C18:2n6c) foi o ácido graxo mais abundante nos óleos da goji berry orgânica (56,31 a 61,87%) e convencional (54,20 a 59,65%), seguido pelos ácidos oleico (C18:1n9c) e linolênico *n*-3 (C18:3n3) e linolênico *n*-6 (C18:3n6). Guoliang *et al.* (2011), Blasi *et al.* (2016) e Rosa *et al.* (2017) também demonstraram resultados semelhantes aos do presente estudo. Fontes ricas de AGI, como o linoleico ( $\omega$ -6), são importantes na dieta. O  $\omega$ -6 é considerado um ácido graxo essencial no crescimento e fortalecimento do tecido epitelial, além de ser o precursor do ácido araquidônico, um componente importante da membrana dos lipídeos estruturais (LESCANO *et al.*, 2015).

O método de Bligh & Dyer mostrou maior conteúdo de AGI nos óleos orgânicos e convencionais, 87,20 e 82,53%, respectivamente (**Tabela 15**). De acordo com Breil *et al.* (2017), os sistemas que utilizam clorofórmio/água/metanol (Bligh & Dyer) são altamente seletivos por compostos lipofílicos e podem ser considerados como "padrão-ouro" para a análise lipídica. Os conteúdos de AGI de óleos de frutas orgânicas e convencionais não mostraram diferença entre os métodos de Soxhlet (78,88 e 73,97%) e Maceração (79,38 e 73,81%). Os solventes utilizados hexano (Soxhlet) e éter etílico (Maceração) possuem propriedades e afinidades químicas semelhantes (REZAIE *et al.*, 2015).

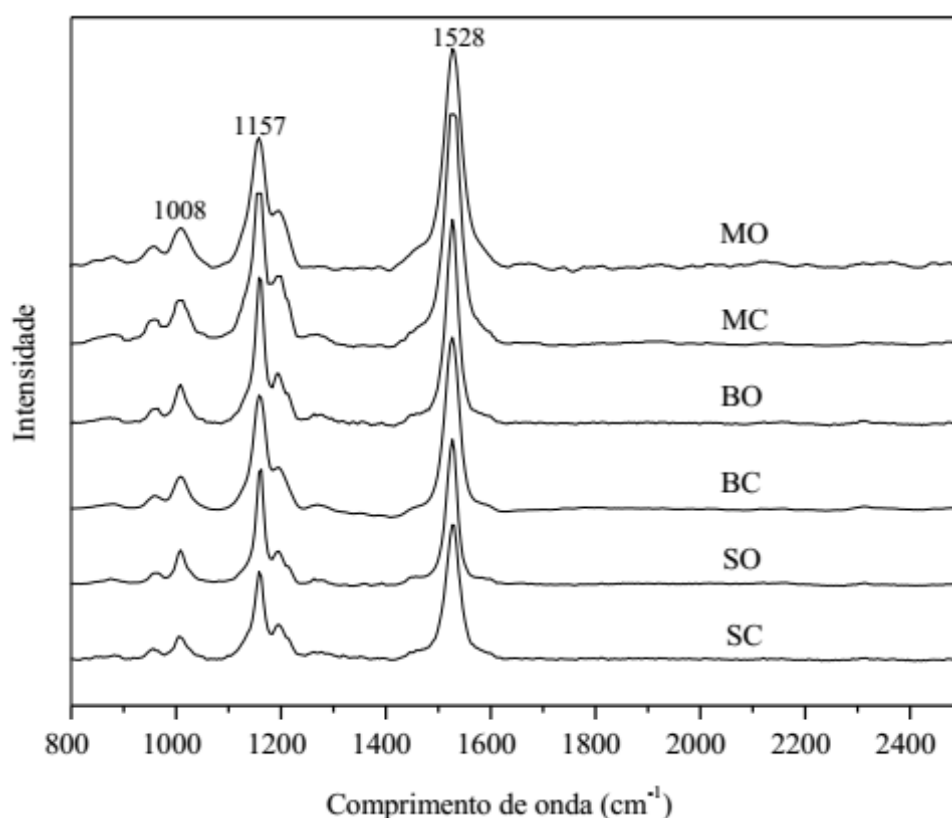
Conforme mostrado na **Tabela 15**, o conteúdo de AGS para óleos da goji orgânica e convencional variaram de 12,80 a 21,12% *versus* 17,47 a 26,19%, respectivamente. Baixos níveis de AGS são desejáveis, pois estes compostos aumentam

os níveis plasmáticos de colesterol, um fator de risco para doenças cardiovasculares (FEÁS *et al.*, 2013).

Maiores conteúdos dos ácidos oleico, linoleico e linolênico *n*-3 e *n*-6 foram determinados em óleos de frutas orgânicas, para todos os métodos de extração (**Tabela 15**). Conforme explicado no item 3.1 deste capítulo, frutas orgânicas tendem a ser mais suscetíveis a situações de estresse fisiológico, produzindo maior quantidade de compostos de defesa. Ácidos graxos são compostos de defesa que desempenham papéis importantes (antioxidantes e antiinflamatórios) em plantas (MACORIS *et al.*, 2012).

### 3.3 Caracterização dos óleos da goji berry por espectroscopia de Raman

A análise de Raman permite concluir se a atribuição de um conjunto particular de números de bandas é verdadeiramente característica de um composto específico ou atribuível a um tipo genérico (DE OLIVEIRA *et al.*, 2010). A **Figura 27** mostra os espectros de Raman de óleos extraídos de frutas goji orgânicas e convencionais pelos métodos de Maceração (MO e MC), Bligh & Dyer (BO e BC) e Soxhlet (SO e SC).



**Figura 27** Espectro de Raman de óleos extraídos da goji berry orgânica e convencional por Maceração (MO e MC), Bligh & Dyer (BO e BC) e Soxhlet (SO e SC).

Para todas as amostras de óleo, o perfil espectral apresentou três picos localizados em regiões específicas, 1008, 1157 e 1528  $\text{cm}^{-1}$ , os quais correspondem à deformação vibratória ( $\text{C}-\text{CH}_3$ ) e alongamento ( $\text{C}-\text{C}$ ) e ( $\text{C}=\text{C}$ ) da molécula, respectivamente (**Figura 27**). Maiores intensidades foram observadas a 1528  $\text{cm}^{-1}$  para todas as amostras de óleos, relacionado ao alto grau de instauração das moléculas. A relação do alto grau de insaturação e do modo vibracional ( $\text{C}-\text{CH}_3$ ) é típica de moléculas de caroteno e carotenoides (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). De acordo com resultados disponíveis na literatura, pode-se dizer que o principal carotenoide presente nos óleos de frutas goji é a zeaxantina, cujos sinais característicos estão próximos de 1156 e 1527  $\text{cm}^{-1}$  (BARANSKA *et al.*, 2013; DE OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Como observado na **Figura 28**, foram obtidas maiores intensidades no espectro de Raman para óleos extraídos pelo método de Maceração, (MO) óleo da fruta orgânica e (MC) óleo da fruta convencional. Segundo Bhosale *et al.* (2004), a intensidade de espectros de Raman pode ser diretamente relacionada ao conteúdo de carotenoides. Portanto, pode-se dizer que os óleos de frutas goji obtidos por Maceração apresentaram maior conteúdo de carotenoides comparado aos demais métodos testados. Foram observadas baixas intensidades para óleos obtidos pelo método de Soxhlet (SO e SC). Isto pode ser explicado pelo uso de altas temperaturas ( $\sim 60^\circ\text{C}$ ) que causam a degradação de grupos funcionais de carotenoides (AZMIR *et al.*, 2013). A isomerização de *all-E*-carotenoides à *Z*-carotenoides também pode ocorrer, com perda da atividade da provitamina A e alterações no metabolismo e biodisponibilidade (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008).

Apesar das pequenas alterações na intensidade do espectro de Raman (**Figura 28**) entre óleos de frutas orgânicas e convencionais, os óleos orgânicos (MO, BO e SO) apresentaram maior intensidade e conseqüentemente maior conteúdo de carotenoides. O conteúdo de carotenoides em plantas é muito variável e a elevação da temperatura ambiente pode aumentar o conteúdo de compostos cromóforos (carotenoides), responsáveis pela transformação da energia solar em energia química (RODRIGUEZ-AMAYA *et al.*, 2008). Além disso, as práticas agrícolas também podem influenciar a composição dos carotenoides, relacionadas a condições ambientais e climáticas adversas. Mercadante e Rodriguez-Amaya (1991) mostraram que vegetais cultivados no sistema orgânico apresentaram concentrações de carotenoides significativamente maiores que vegetais cultivados com fertilizantes químicos.

### 3.4 Atividade antioxidante

Os resultados da capacidade antioxidante pelos ensaios *in vitro* FRAP, ABTS e DPPH dos óleos extraídos da goji berry orgânica e convencional são mostrados na **Tabela 16**.

O teste do FRAP baseia-se na redução do íon férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), formando o complexo colorido ferroso-tripiridiltriazina (TPTZ) através da transferência do par de elétrons por compostos antioxidantes. O alto potencial de redução indica alta capacidade antioxidante (REZAIE *et al.*, 2015). A capacidade antioxidante dos óleos extraídos da goji orgânica e convencional variou de 1,21 a 2,23 e 1,40 a 2,43 mmolTE/100 g, respectivamente. Óleos obtidos por Maceração mostraram maior capacidade ( $p \leq 0,05$ ) de reduzir o íon  $\text{Fe}^{3+}$  comparados aos óleos extraídos por Soxhlet e Bligh & Dyer.

No ensaio de ABTS, um radical ferro-mioglobina é formado a partir da metamioglobina e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que oxida o ABTS para produzir um radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$ . A capacidade antioxidante é determinada pelo potencial de eliminação do radical  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  (HÖFERL *et al.*, 2014). A capacidade antioxidante dos óleos orgânicos e convencionais variou de 32,21 a 39,44 e 30,84 a 40,04 mmolTE/100 g, respectivamente. Óleos obtidos por Maceração e Bligh & Dyer apresentaram uma eliminação de radicais  $\text{ABTS}^{+\bullet}$  significativamente ( $p \leq 0,05$ ) maior que óleos extraídos por Soxhlet.

O teste da atividade de eliminação de radicais DPPH $^{\bullet}$  foi utilizado para determinar a capacidade antioxidante de óleos extraídos de frutas goji. A capacidade antioxidante é relacionada com a capacidade de transferência de átomos de hidrogênio e elétrons para radicais DPPH $^{\bullet}$  (HÖFERL *et al.*, 2014). As atividades antioxidantes dos óleos orgânicos e convencionais variaram de 33,89 a 40,94 e 19,13 a 40,06 mmolTE/100 g, respectivamente. Para o ensaio de DPPH, o método de Maceração mostrou-se o mais eficiente ( $p \leq 0,05$ ) na extração de compostos com alta atividade antioxidante.

**Tabela 16** Atividade antioxidante de óleos da goji berry orgânica e convencional por FRAP, ABTS e DPPH<sup>1</sup>.

Métodos	Orgânica			Convencional		
	FRAP	ABTS	DPPH	FRAP	ABTS	DPPH
Soxhlet	1,99 ± 0,08 <sup>b</sup>	32,21 ± 0,39 <sup>b</sup>	34,07 ± 1,49 <sup>b</sup>	1,42 ± 0,02 <sup>b</sup>	30,84 ± 0,15 <sup>b</sup>	19,13 ± 0,05 <sup>c</sup>
Maceração	2,23 ± 0,03 <sup>a</sup>	39,44 ± 0,57 <sup>a</sup>	40,94 ± 2,74 <sup>a</sup>	2,43 ± 0,41 <sup>a</sup>	40,04 ± 0,97 <sup>a</sup>	40,06 ± 0,73 <sup>a</sup>
Bligh & Dyer	1,21 ± 0,11 <sup>c</sup>	37,43 ± 3,11 <sup>a</sup>	33,89 ± 0,75 <sup>b</sup>	1,40 ± 0,02 <sup>b</sup>	39,49 ± 0,58 <sup>a</sup>	34,24 ± 0,25 <sup>b</sup>

<sup>1</sup>Valores expressos como média ± desvio padrão ( $n = 3$ ) em mmolTE/100 g. Diferentes letras indicam diferenças significativas entre cada coluna ( $p \leq 0,05$ ).

A partir dos resultados obtidos, pode-se dizer que as amostras de óleo da goji berry cultivada nos sistemas orgânico e convencional apresentaram excelente atividade antioxidante. Na literatura, diferentes estudos também mostram o alto potencial antioxidante de óleos de diferentes espécies de frutas goji. Dahech *et al.* (2013) mostraram que óleos de *Lycium shawii* apresentaram uma capacidade de eliminação de radicais DPPH<sup>•</sup> maior que o antioxidante sintético BHT. Guoliang *et al.* (2011) também observaram maior capacidade de eliminação de radicais DPPH<sup>•</sup> de óleos de *Lycium barbarum* comparados aos antioxidantes naturais, ácido ascórbico e  $\alpha$ -tocoferol.

Conforme mostrado na **Tabela 16**, o método de Maceração apresentou a maior capacidade antioxidante pelos ensaios de FRAP e DPPH. Diferentes compostos lipofílicos podem contribuir para a capacidade antioxidante de óleos, como ácidos graxos, tocoferóis e carotenoides. Guoliang *et al.* (2011) relacionaram a alta atividade antioxidante dos óleos de *Lycium barbarum* com a alta porcentagem de ácidos graxos insaturados. Rosa *et al.* (2017) mostraram que  $\alpha$ -tocoferóis e carotenoides (*all-E*-zeaxantina) presentes no óleo de *Lycium europaeum* apresentaram alta capacidade de seqüestro de radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>. Portanto, a maior atividade antioxidante obtida para o método de Maceração pode ser explicado pelo alto conteúdo de AGI (RMN) e principalmente pelo elevado teor de carotenoides (Raman). A alta atividade antioxidante dos carotenoides está ligada ao sistema conjugado de duplas ligações. A zeaxantina, principal carotenoide em óleos de goji berry, fornece proteção máxima contra espécies altamente reativas devido ao grande número de duplas ligações na estrutura molecular (Krinsky, 2001).

Os óleos da goji berry orgânica apresentaram maior atividade antioxidante ( $p \leq 0,05$ , teste *t-student*) comparados aos óleos extraídos de frutas cultivadas de forma convencional (**Tabela 16**). Conforme os resultados obtidos através das análises de RMN e Raman, óleos de frutas orgânicas apresentaram maior conteúdo de ácidos graxos e carotenoides, compostos de defesa produzidos em resposta a condições de estresse fisiológico. Além disso, fatores genéticos, condições climáticas, estágio de maturação, luz e sais também podem influenciar o conteúdo e a atividade antioxidante de compostos de fontes vegetais (PERTUZATTI *et al.*, 2013).

### 3.5 Atividade antimicrobiana

A **Tabela 17** mostra a concentração mínima inibitória (CMI) dos óleos da goji berry orgânica e convencional contra bactérias gram positivas (*Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*) e gram negativas (*Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*).

**Tabela 17** Concentrações mínimas inibitórias (CMI's) obtidas para óleos da goji orgânica e convencional.

Amostras	CMI (mg/mL)			
	Gram positivas		Gram negativas	
	<i>B. cereus</i> <sup>1</sup>	<i>S. aureus</i> <sup>2</sup>	<i>S. enteritidis</i> <sup>3</sup>	<i>E. coli</i> <sup>4</sup>
Amoxicilina (mg/L)	4,00	0,25	1,00	12,50
Óleo da fruta orgânica				
Soxhlet	25,00	25,00	200,00	100,00
Maceração	3,12	25,00	100,00	50,00
Bligh & Dyer	12,50	12,50	200,00	100,00
Óleo da fruta convencional				
Soxhlet	12,50	50,00	> 200,00	> 200,00
Maceração	6,25	25,00	200,00	100,00
Bligh & Dyer	25,00	25,00	200,00	100,00

<sup>1</sup>*Bacillus cereus*. <sup>2</sup>*Staphylococcus aureus*. <sup>3</sup>*Salmonella enteritidis*. <sup>4</sup>*Escherichia coli*.

O controle negativo (DMSO) não apresentou efeito antimicrobiano em todas as bactérias testadas enquanto que o controle positivo (amoxicilina) apresentou diferentes valores de CMI para diferentes cepas de bactérias, variando de 0,25 a 12,50 mg/L. Todas as amostras de óleos mostraram atividade antimicrobiana para todas as bactérias testadas, exceto óleos da goji berry convencional extraídos por Soxhlet. Estes óleos não inibiram cepas de *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli* nas concentrações testadas. Estes resultados podem ser explicados pela baixa concentração de AGI (RMN) e carotenoides (espectroscopia de Raman) em óleos obtidos pelo método de Soxhlet.

Estudos mostram que ácidos graxos e carotenoides apresentam funções antimicrobianas importantes. Salem, Ali e Mansour (2014) mostraram que os ácidos graxos insaturados da madeira, casca e folhas de *Brachychiton diversifolius* foram eficazes contra bactérias gram positivas, *Bacillus subtilis* e *Sarcina lutea*. Os ácidos graxos poliinsaturados exibiram atividade antibacteriana contra *Propionibacterium acnes* e *Staphylococcus aureus* nas concentrações testadas (32-1024 mg/L) por Desbois e Lawlor (2013). Os carotenoides extraídos de esponjas marinhas (1 mg/mL) inibiram cepas de *Salmonella typhi* e *Escherichia coli* (SIBERO *et al.*, 2016). Rostami, Hamedi e



Yolmeh (2016) relataram que carotenoides extraídos de *Micrococcus roseus* e *Rhodotorula glutinis* foram capazes de inibir as bactérias gram negativas, *Salmonella enteritidis* e *Escherichia coli*.

Como mostrado na **Tabela 17**, bactérias gram negativas (maiores valores de MIC's) foram mais resistentes aos antimicrobianos naturais que bactérias gram positivas. As diferenças estruturais na parede celular bacteriana podem explicar esses resultados. Bactérias gram negativas apresentam além da membrana celular, uma camada externa composta de fosfolípidos, proteínas e lipopolissacarídeos, impermeáveis a uma grande quantidade de moléculas (SALEM, ALI e MANSOUR, 2014). No entanto, os resultados do presente estudo mostraram que óleos de frutas goji obtidos pelo método de Maceração podem resultar em uma maior inibição das bactérias gram negativas comparado aos demais métodos testados. O alto conteúdo de ácido linoleico e o maior teor de zeaxantina obtidos para estes óleos podem explicar estes resultados (**Tabela 17**). Segundo Waller *et al.* (2008), o ácido linoleico possui alta seletividade pela enzima FabI das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, inibindo o crescimento microbiano. A zeaxantina é composta por grupos hidroxil ativos, que causam a deslocalização de elétrons e atuam como trocadores de prótons, reduzindo o gradiente através da membrana bacteriana. Isso causará o colapso da força motriz dos prótons e esgotamento da reserva de ATP, levando à morte celular (ULTEE, BENNIK e MOEZELAAR, 2002).

Óleos extraídos de frutas goji orgânicas apresentaram maior atividade antimicrobiana (3,12 a 200,00 mg/mL) comparados aos óleos de frutas cultivadas em sistemas convencionais (6,25 a > 200,00 mg/mL) para todas as cepas de bactérias testadas. Estes resultados podem ser explicados pelo maior conteúdo de componentes antimicrobianos (ácidos graxos e carotenoides) em óleos orgânicos.

## CONCLUSÃO

Os maiores rendimentos para os óleos extraídos da goji berry orgânica e convencional foram obtidos pelo método de Soxhlet, relacionados à alta temperatura (~ 60 °C) aplicada neste método. As espectroscopias de RMN e Raman são métodos analíticos rápidos e não destrutivos que podem ser aplicados com sucesso na identificação de ácidos graxos e carotenoides em óleos de futas goji, respectivamente. O método de Bligh & Dyer foi o mais eficiente para a extração de AGI em óleos de goji berry, sendo o ácido linoleico o ácido graxo mais abundante. Os óleos obtidos pelo método de Maceração apresentaram maiores conteúdos de carotenoides comparados aos demais métodos, e a zeaxantina foi o principal carotenoide presente. Foram obtidas maiores atividades antioxidantes e antimicrobianas para os óleos extraídos por Maceração, relacionados ao alto teor de AGI e carotenoides. Os óleos de frutas orgânicas apresentaram os maiores rendimentos, melhores fontes de AGI e carotenoides e alta atividade antioxidante e antimicrobiana em comparação com os óleos de frutas convencionais. Além disso, frutas cultivadas com adubos orgânicos são mais seguras quanto a presença de agrotóxicos. Estes resultados tornam o óleo da goji berry orgânica (*Lycium barbarum* L.) um componente seguro e especial para aplicações na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia.

## CONCLUSÕES FINAIS

As frutas goji cultivadas no sistema orgânico e convencional podem contribuir nutricionalmente na dieta, pois apresentam elevados conteúdos de açúcares totais disponíveis e fibras alimentares, e são fontes dos minerais essenciais, Mg, Fe, Cu e Mn. Os parâmetros qualitativos de acidez titulável total, pH, sólidos solúveis totais, atividade de água e cor foram desejáveis e tornam estas frutas importantes ingredientes para a formulação de novos produtos na indústria alimentícia. Porém, frutas convencionais apresentaram concentrações de Hg e Pb acima dos níveis máximos estabelecidos.

O solvente etanol 70% foi eficiente na extração de compostos fenólicos com elevada atividade antioxidante de frutas orgânicas. A metodologia de superfície de resposta (MSR) mostrou-se uma ferramenta útil na avaliação dos efeitos da temperatura, tempo e relação sólido-líquido, e na obtenção das condições ótimas de extração para maximizar o conteúdo de compostos fenólicos. O ácido siríngico foi identificado e quantificado pela primeira vez em frutas goji. O extrato fenólico de frutas goji orgânicas foi mais eficiente contra a deterioração oxidativa do óleo de soja que os antioxidantes sintéticos BHT e BHA.

O ensaio mais adequado para a quantificação de fenólicos totais em amostras de goji berry foi o *Fast Blue BB*. O método *Quencher* mostrou um conteúdo de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de 3 a 20 vezes maiores em amostras sólidas que em extratos. As amostras de goji berry podem desempenhar importantes funções na proteção ocular, devido à alta concentração do carotenoide (all-*E*)-zeaxantina. A goji berry pode ser considerada uma importante fonte de vitamina C com funções antimicrobianas.

O método de Maceração se mostrou um ótimo método para a obtenção de óleos de amostras de goji berry. O elevado conteúdo de carotenoides, ácidos graxos insaturados (*AGI*), e alta atividade antioxidante e antimicrobiana, tornam o óleo da goji berry um importante ingrediente na formulação de cosméticos, fármacos e alimentos. As espectroscopias de RMN e Raman podem ser aplicadas na identificação rápida e não destrutiva de ácidos graxos e carotenoides em óleos de frutas goji.

## REFERÊNCIAS

- ABBEDDOU, S., PETRAKIS, C., PÉREZ-GÁLVEZ, A., KEFALAS, P., HORNERO-MÉNDEZ, D. Effect of Simulated Thermo-Degradation on the Carotenoids, Tocopherols and Antioxidant Properties of Tomato and Paprika Oleoresins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.90, p.1697-1703, 2013.
- ABDENNACER, B., KARIM, M., YASSINE, M., NESRINE, R., MOUNA, D., MOHAMED, B. Determination of phytochemicals and antioxidant activity of methanol extracts obtained from the fruit and leaves of Tunisian *Lycium intricatum* Boiss. **Food Chemistry**, v.174, p.577-584, 2015.
- AGOURRAM, A.; GHIRARDELLO, D.; RANTSIOU, K.; ZEPPA, G.; BELVISO, S.; ROMANE, A.; OUFDU, K.; GIORDANO, M. Phenolic content, antioxidant potential and antimicrobial activities of fruit and vegetable by-product extracts. **International Journal of Food Properties**, v.16, p.1092-1104, 2013.
- AKBAS, M.Y., ÖLMEZ, H. Inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* on iceberg lettuce by dip wash treatments with organic acids [electronic resource]. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.619-624, 2007.
- ALBERTI, A., ZIELINSKI, A.A.F., ZARDO, D.M., DEMIATE, I.M., NOGUEIRA, A., MAFRA, L.I. Optimisation of the extraction of phenolic compounds from apples using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.149, p.151-158, 2014.
- AL-FATIMI, M., WURSTER, M., SCHRÖDER, G., LINDEQUIST, U. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.657-666, 2007.
- AMAGASE, H., NANCE, D.M.A. Randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical study of the general effects of standardized *Lycium barbarum* (Goji) Juice, GoChi TM. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v.14, p.403-12, 2008.
- AMAGASE, H., SUN, B., BOREK, C. *Lycium barbarum* (goji) juice improves in vivo antioxidant biomarkers in serum of healthy adults. **Nutrition Research**, v.29, p.19-25, 2009.
- AMAGASE, H. Comparison of *Lycium barbarum* - containing liquid dietary supplements to caffeinated beverages on energy/caloric metabolism activity and salivary adrenocortical hormone levels in healthy human adults. **FASEB Journal**, p.24-540, 2010.
- AMAGASE, H.; FARNSWORTH, N. R. A review of botanical characteristics, phytochemistry, clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit (Goji). **Food Research International**, v.44, p.1702-1717, 2011.
- ANVISA. Esclarecimentos sobre a avaliação de segurança da espécie vegetal *Lycium barbarum*, também conhecida como *goji berry*. **Informe técnico**, n.66, 01 de junho de 2015.

AOAC. **Association Of Official Analytical Chemists. Official and tentative methods of the AOAC International.** Maryland: AOAC, 1997.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática.** Viçosa: UFV, 2006.

ARROYO-MARTINEZ, Q., SÁENZ, M.J., ARIAS, F.A., ACOSTA, M.S. *Lycium barbarum*: A new hepatotoxic “natural” agent? Digestive and Liver Disease, p.743-749, 2011.

AZMIR, J., ZAIDUL, I.S.M., RAHMAN, M.M., SHARIF, K.M., MOHAMED, A., SAHENA, F., JAHURUL, M.H.A., GHAFOOR, K., NORULAINI, N.A.N., OMAR, A.K.M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v.117, p.426-436, 2013.

BADARINATH, A.V., RAO, K.M., CHETTY, C.M.S., RAMKANTH, S., RAJAN, T.V.S., GNANAPRAKASH, K. A review on in-vitro antioxidant methods: comparisons, correlations and consideration. **International Journal of PharmTech Research**, v.2, p.1276-1285, 2010.

BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, p.191-203, 2006.

BARANSKA, M., ROMAN, M., DOBROWOLSKI, J.C., SCHULZ, H., BARANSKI, R. Recent advances in Raman analysis of plants: alkaloids, carotenoids, and polyacetylenes. **Current Analytical Chemistry**, v.9, p.108-127, 2013.

BARISON, A., WERNER, C., DA SILVA, P., CAMPOS, F.R., SIMONELLI, F., LENZB, C.A., FERREIRA, A.G. A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.48, p.642-650, 2010.

BASSANI, D.C., NUNES, D.S., GRANATO, D. Optimization of phenolics and flavonoids extraction conditions and antioxidant activity of roasted yerba-mate leaves (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., *Aquifoliaceae*) using Response Surface Methodology. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.6, p.923-933, 2014.

BELITZ, H.D., GROSCHE, W., SCHIEBERLE, P. Fruits and fruit products. **Food Chemistry**, p.807-861, 2009.

BELWAL, T., DHYANI, P., BHATT, I.D., RAWAL, R.S., PANDE, V. Optimization extraction conditions for improving phenolic content and antioxidant activity in *Berberis asiatica* fruits using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, v.207, p.115-124, 2016.

BENZIE, I.F., STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma as a measure of ‘antioxidant power’: The FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BERNHOF, A. **A brief review on bioactive compounds in plants**. In: Proceedings from a symposium held at The Norwegian Academy of Science and Letters, Oslo, Norway, 2010.

BIANCHI, M.L.P., ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n.2, p.123-130, 1999.

BLASI, F., MONTESANO, D., SIMONETTI, M.S., COSSIGNANI, L. A simple and rapid extraction method to evaluate the fatty acid composition and nutritional value of goji berry lipid. **Food Analytical Methods**, v.10, p.970-979, 2017.

BLIGH, E.G., DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemical Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.

BHOSALE, P. ERMAKOV, I.V., ERMAKOVA, M.R., GELLERMANN, W., BERNSTEIN, P.S. Resonance Raman quantification of nutritionally important carotenoids in fruits, vegetables, and their juices in comparison to high-pressure liquid chromatography analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3281-3285, 2004.

BORGUINI, R.G., BASTOS, D.H.M., NETO, J.J.M., CAPASSO, F.S., TORRES, E.A.F.S. Antioxidant potential of tomatoes cultivated in organic and conventional systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.56, p.521-529, 2013.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Portaria n. 27 SVS/MS, de 13 de janeiro de 1998. A Secretaria de Vigilância Sanitária do MS aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional complementar. **Diário Oficial da União**, 16 jan. 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 16 de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, constante do anexo desta Portaria. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 03 dez. 1999.

BREIL, C., VIAN, M.A., ZEMB, T., KUNZ, W., CHEMAT, F. “Bligh and Dyer” and Folch methods for solid–liquid–liquid extraction of lipids from microorganisms. comprehension of solvation mechanisms and towards substitution with alternative solvents. **International Journal of Molecular Sciences**, v.18, p.1-21, 2017.

CACACE, J.E., MAZZA, G. Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. **Journal of Food Engineering**, v.59, p.379-389, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.131-134, 2005.

CAPRIOLI, G., GIUSTI, F., BALLINI, R., SAGRATINI, G., VILA-DONAT, P., VITTORI, S., FIORINI, D. Lipid nutritional value of legumes: Evaluation of different extraction methods and determination of fatty acid composition. **Food Chemistry**, v.192, p.965-971, 2016.

CARDOSO, P.C., TOMAZINI, A.P.B., STRINGHETA, P.C., RIBEIRO, S.M.R., PINHEIRO-SANT'ANA, H.M. Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. **Food Chemistry**, v.126, p.411-416, 2011.

CARPENTER, K.L., VAN DER VEEN, C., HIRD, R., DENNIS, I.F., DING, T., MITCHINSON, M.J. The carotenoids -carotene, canthaxanthin and zeaxanthin inhibit macrophagemediated LDL oxidation. **FEBS Letters**, v.401, p.262-266, 1997.

CERQUEIRA, F.M., MEDEIROS, M.H.G., AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p.441-449, 2007.

CHAO, J.C., CHIANG, S.W., WANG, C.C., TSAI, Y.H., WU, M.S. Hot water-extracted *Lycium barbarum* and *Rehmannia glutinosa* inhibit proliferation and induce apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n.28, p.4478-4484, 2006.

CHERRINGTON, C. A., HINTON, M., MEAD, G. C., CHOPRA, I. Organic Acids: Chemistry, Antibacterial Activity and Practical Applications. **Advances in Microbial Physiology**, v.32, p.87-108, 1991.

CHOW, C.K. Fatty acids in foods and their health implications. **Fatty acid classification and nomenclature**. 3ed. New York: Taylor and Francis Group, p.1-17, 2008.

CHUNG, M., NAGELLA, P., AHN, Y., KIM, S., AHMAD, A. Composition of the essential oil and petroleum ether extract of *Lycium chinense* Miller fruits and antioxidant activity of its several extracts. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, p.5973-5981, 2011.

CODEx ALIMENTARIUS. **General standard for contaminants and toxins in food and feed**. CODEX STAN 193-1995, 2015.

COMUNIAN, T.A., BOILLON, M.R.G., THOMAZINI, M., NOGUEIRA, M.S., CASTRO, I.A., FAVARO-TRINDADE, C.S. Protection of echium oil by microencapsulation with phenolic compounds. **Food Research International**, v.88, p.114-121, 2016.

CONNER, D.E., KOTROLA, J.S. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.1, p.382-385, 1995.

CONDEZO-HOYOS, L., ABDERRAHIM, F., ARRIBA, S.M., GONZÁLEZ, M.C. A novel, micro, rapid and direct assay to assess total antioxidant capacity of solid foods. **Talanta**, v.138, p.108-116, 2015.

CORDEIRO, A.M.T.M., MEDEIROS, M.L., SILVA, M.A.A.D., SILVA, I.A.A., SOLEDADE, L.E.B., SOUZA, A.L., QUEIROZ, N., SOUZA, A.G. Rancimat and PDSC accelerated techniques for evaluation of oxidative stability of soybean oil with plant extracts. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.114, p.827-832, 2013.

CROTEAU, R., KUTCHAN, T.M., LEWIS, N.G. **Natural products (secondary metabolites)**. In: Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (Eds.), Biochemistry and molecular biology of plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, p.1250-1318, 2000.

CUSHNIE, T.P.T., HAMILTON, V. E. S., CHAPMAN, D.G. TAYLOR, P.W., LAMB, A. J. Aggregation of *Staphylococcus aureus* following treatment with the antibacterial flavonolgalangin. **Journal of Applied Microbiology**, v.103, n.5, p.1562-1567, 2007.

DAHECH, I., FARAH, W., TRIGUI, M., HSSOUNA, A.B., BELGHITH, H., BELGHITH, K.S., ABDALLAH, F.B. Antioxidant and antimicrobial activities of *Lycium shawii* fruits extract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.60, p.328-333, 2013.

DAI, J., MUMPER, R.J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v.15, p.7313-7352, 2010.

DAMODARAN, S., PARKIN, K.L., FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

DA SILVA, L.M.R., DE FIGUEIREDO, E.A.T., RICARDO, N.M.P.S., VIEIRA, I.G.P., DE FIGUEIREDO, R.W., BRASIL, I.M. Quantification of bioactive compounds in pulps and by-products of tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.143, p.398-404, 2014.

DE OLIVEIRA, V.E., CASTRO, H.V., EDWARDS, H.G.M., DE OLIVEIRA, L.F.C. Carotenes and carotenoids in natural biological samples: a Raman spectroscopic analysis. **Journal Raman Spectroscopy**, v.41, p.642-650, 2010.

DE OLIVEIRA, V.E., MIRANDA, M.A.C.N., SOARES, M.C.S., EDWARDS, H.G.M., DE OLIVEIRA, L.F.C. Study of carotenoids in cyanobacteria by Raman spectroscopy. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.150, p.373-380, 2015.

DE SOUZA, V.R., PEREIRA, P.A.P., DA SILVA, T.L.T., LIMA, L.C.O., PIO, R., QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v.156, p.362-368, 2014.

DESBOIS, A.P., LAWLOR, K.C. Antibacterial Activity of Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids against *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus aureus*. **Marine Drugs**, v.11, p.4544-4557, 2013.



DERRINGER, G., SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v.12, p.214-219, 1980.

DONNO, D.; BECCARO, G. L.; MELLANO, M. G.; CERUTTI, A. K.; BOUNOUS, G. Goji berry fruit (*Lycium* spp.): antioxidant compound fingerprint and bioactivity evaluation. **Journal of Functional Foods**, v.18, p.1070-1085, 2014.

DONNO, D., MELLANO, M.G., RAIMONDO, E., CERUTTI, A.K., PRGOMET, Z., BECCARO, G.L. Influence of applied drying methods on phytochemical composition in fresh and dried goji fruits by HPLC fingerprint. **European Food Research and Technology**, v.242, p.1961-1974, 2016.

DONG, J.Z., LU, D.Y., WANG, Y. Analysis of flavonoids from leaves of cultivated *Lycium barbarum* L. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.64, n.3, p.199-204, 2009.

DOORES, S. **Organic acids**. In: Brannen AL and Davidson PM (eds) Antimicrobials in Foods, 2ed. Chapter 4. New York, NY: Marcel Dekker, Inc, p.95-136, 1993.

DUAN, H., CHEN, Y., CHEN, G. Far infrared-assisted extraction followed by capillary electrophoresis for the determination of bioactive constituents in the leaves of *Lycium barbarum* Linn. **Journal of Chromatography A**, v.1217, n27, p.4511-4516, 2010.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medicinal**, v.64, p.711-713, 1998.

ENDES, Z., USLU, N., ÖZCAN, M.M., ER, F. Physico-chemical properties, fatty acid composition and mineral contents of goji berry (*Lycium barbarum* L.) fruit. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v.21, p.36-40, 2015.

ERNAWITA, W.R.A., HESSE, J., HIPLER, U.C., ELSNER, P., BÖHM, V. Carotenoids of indigenous citrus species from Aceh and its *in vitro* antioxidant, antidiabetic and antibacterial activities. **European Food Research and Technology**, v.11, p.1869-1881, 2016.

FEÁS, X., ESTEVINHO, L.M., SALINERO, C., VELA, P., SAINZ, M.J., VÁZQUEZ-TATO, M.P., SEIJAS, J.A. Triacylglyceride, antioxidant and antimicrobial feature of virgin *Camellia oleifera*, *C. reticulata* and *C. sasanqua* oils. **Molecules**, v.18, p.4573-4587, 2013.

FELTRIN, D.M. Efeitos de fontes de potássio na infestação de *Bemisia Tabaci* biótipo B e nas características de frutos de tomateiro sob ambiente protegido. **Bragantia**, v.61, p. 49-57, 2002.

FENNEMA, O.R. (1996). **Food Chemistry**. New York: Marcel Dekker Inc.

FENG, Z., JIA, H., LI, X., BAI, Z., LIU, Z., SUN, L., ZHU, Z., BUCHELI, P., BALLEVRE, O., WANG, J., LIU, J. A milk-based wolfberry preparation prevents prenatal stress-induced cognitive impairment of offspring rats, and inhibits oxidative damage and mitochondrial dysfunction in vitro. **Neurochemical Research**, v.35, n.5, p.702-711, 2010.

FERREIRA, S.M.R., de FREITAS, R.J.S., KARKLE, E.N.L., de QUADROS, D.A., TULLIO, L.T., de LIMA, J.J. Qualidade do tomate de mesa cultivado nos sistemas convencional e orgânico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.224-230, 2010.

FIEDOR, J., BURDA, K. Potential role of carotenoids as antioxidants in human health and disease. **Nutrients**, v.6, p.466-488, 2014.

FRANCO, D., PATEIRO, M., AMADO, I.R., PEDROUSO, M.L., ZAPATA, C., VAZQUEZ, J.A., LORENZO, J.M. Antioxidant ability of potato (*Solanum tuberosum*) peel extracts to inhibit soybean oil oxidation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v.118, p.1891-1902, 2016.

FRASER, P.D., BRAMLEY, P.M. Review - The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. **Progress in Lipid Research**, v.43, p.228-265, 2004.

FUKUDA, T., YOKOYAMA, J., OHASHI, H. Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium* (Solanaceae): Inferences from chloroplast DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.19, p.246-258, 2011.

GALHIANE, M.S., RISSATO, S.R., CHIERICE, G.I., ALMEIDA, M.V., SILVA, L.C. Influence of different extraction methods on the yield and linalool content of the extracts of *Eugenia uniflora* L. **Talanta**, v.70, p.286-292, 2006.

GARCÍA, A.A., CARRIL, E.P. **Metabolismo secundario de plantas**. Reduca (Biología), 2(3), 2009.

GENAUST, H. **Etymologisches Wörterbuch der botanischen Pflanzennamen**, 3. Auflage. Basel; Birkhäuser Verlag, 1996.

GENOVESE, M.I., PINTO, M.S., GONÇALVES, A.E.S.S., LAJOLO, F.M. Bioactive compounds and antioxidant capacity of exotic fruits and commercial frozen pulps from Brazil. **Food Science and Technology International**, v.14, p.207-214, 2008.

GIUSTI, M.M., WROLSTAD, R.E. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2001.

GOMIERO, T., PIMENTEL, D., PAOLETTI, M.G. Environmental impact of different agricultural management practices conventional vs organic agriculture. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.30, p.95-124, 2011.

GRANATO, D., CALADO, V.M.A., JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in Food Science and Technology. **Food Research International**, v.55, p.137-149, 2014.

GUOLIANG, L., JUNYOU, S., YOURUI, S., ZHIWEI, S., LIAN, X., JIE, Z., JINMAO, Y., YONGJUN, L. Supercritical CO<sub>2</sub> cell breaking extraction of *Lycium barbarum* seed oil and determination of its chemical composition by HPLC/APCI/MS and antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.44, p.1172-1178, 2011.

HAMINIUK, C.W.I., MACIEL, G.M., PLATA-OVIEDO, M.S.V., PERALTA, R.M. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v.47, p. 2023-2044, 2012.

HE, N., YANG, X., JIAO, Y., TIAN, L., ZHAO, Y. Characterisation of antioxidant and antiproliferative acidic polysaccharides from Chinese wolfberry fruits. **Food Chemistry**, v.133, p.978-989, 2012.

HEMPEL, J., SCHÄDLE, C.N., SPRENGER, J., HELLER, J., CARLE, R., SCHWEIGGERT, R.M. Ultrastructural deposition forms and bioaccessibility of carotenoids and carotenoid esters from goji berries (*Lycium barbarum* L.). **Food Chemistry**, v.218, p.525-533, 2017.

HERNÁNDEZ, Y., LOBO, M.G., GONZÁLEZ, M. Factors affecting sample extraction in the liquid chromatographic determination of organic acids in papaya and pineapple. **Food Chemistry**, v.114, n.2, 734-741, 2009.

HJELMAR, U. Consumers' purchase of organic food products. A matter of convenience and reflexive practices. **Appetite**, v.56, p.336-344, 2011.

HOGAN, S., CHUNG, H., ZHANG, L., LI, J., LEE, Y., DAI, Y. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from açai. **Food Chemistry**, v.18, p.208-214, 2010.

HO, Y.S., YU, M.S., YANG, X.F., SO, K.F., YUEN, W.H., CHANG, R.C. Neuroprotective effects of polysaccharides from wolfberry, the fruits of *Lycium barbarum*, against homocysteine-induced toxicity in rat cortical neurons. **Journal of Alzheimer's Disease**, v.19, n.3, p.813-827, 2010.

HÖFERL, M., STOILOVA, I., SCHMIDT, E., WANNER, J., JIROVETZ, L., TRIFONOVA, D., KRASTEV, L., KRASTANOV, A. Chemical composition and antioxidant properties of juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil. Action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. **Antioxidants**, v.3, p.81-98, 2014.

HOSSAIN, M.A., KALBANI, M.A.A., AL-FARSI, S.A., WELI, A.M., ALRIYAMI, Q. Comparative study of total phenolics, flavonoids contents and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of different polarities fruits crude extracts of *Datura metel* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.4, p.378-383, 2014.

HUANG, Y., LU, J., SHEN, Y., LU, J. The protective effects of total flavonoids from *Lycium barbarum* L. on lipid peroxidation of liver mitochondria and red blood cell in rats. **Journal of Hygiene Research**, v.28, n.2, p.115-116, 1999.

HUANG, X., YANG, M., WU, X., YAN, J. Study on protective action of *Lycium barbarum* polysaccharides on DNA impairments of testicle cells in mice. **Journal of Hygiene Research**, v.32, n.6, p.599-601, 2003.

HUANG, D., OU, B., PRIOR, A. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1841-1856, 2005.

IGNAT, I., VOLF, I., POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821-1835, 2011.

INBARAJ, B.S., LU, H., HUNG, C.F., WU, W.B., LIN, C.L., CHEN, B.H. Determination of carotenoids and their esters in fruits of *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-APCI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, p.812-818, 2008.

INBARAJ, B.S., LU, H., KAO, T.H., CHEN, B.H. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in *Lycium barbarum* Linnaeus by HPLC-DAD-ESI-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.51, n.3, p.549-556, 2010.

IONICA, M.E., NOUR, V., TRANDAFIR, I. Polyphenols content and antioxidant capacity of goji fruits (*Lycium chinense*) as affected by the extraction solvents. **South Western Journal of Horticulture, Biology and Environment**, v.3, n.2, p.121-129, 2012.

JIA, Z., TANG, M., WU, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, p.555-559, 1999.

JIN, Z.C., JIA, Y., WANG, L., LI, X. Antibacterial effects of *Lycium barbarum* extract. **Inner Mongolia Journal of Medicine**, v.15, n.4, p.203, 1995.

KEVERS, C., FALKOWSKI, M., TABART, J., DEFRAIGNE, J.O., DOMMES, J., PINCEMAIL, J. Evolution of antioxidant capacity during storage of selected fruits and vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.8596-8603, 2007.

KRINSKY, N.I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, v.17, p.815-817, 2001.

KULCZYŃSKI, B., GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A. Goji Berry (*Lycium barbarum*): Composition and Health Effects – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Science**, v. 66, n.2, p.67-75, 2016.

LARRAURI, J.A., RUPÉREZ, P., SAURA-CALIXTO, F. Effect of drying temperature on the stability of polyphenols and antioxidant activity of red grape pomace peels. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.1390-1393, 1997.

LESCANO, C.H., OLIVEIRA, I.P., SILVA, L.R., BALDIVIA, D.S., SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J., ARRUDA, E.J., MORAES, I.C.F., LIMA, F.F. Nutrients content, characterization and oil extraction from *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. fruits. **African Journal of Food Science**, v.9, p.113-119, 2015.

LI, H., DENG, Z., WU, T., LIU, R., LOEWEN, S., TSAO, R. Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. **Food Chemistry**, v.130, p.928-936, 2012.

LIYANA-PATHIRANA, C., SHAHIDI, F. Optimization of extraction of phenolic compounds from wheat using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.93, p.47-56, 2005.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, v.46, p.207-219, 2007.

LIU, Y., DU, Y.Q., WANG, J.H., ZHA, X.Q., ZHANG, J.B. Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.64, p.63-68, 2014.

LLORENT-MARTÍNEZ, E.J., FERNÁNDEZ-DE-CÓRDOVA, M.L., ORTEGA-BARRALES, P., RUIZ-MEDINA, A. Characterization and comparison of the chemical composition of exotic superfoods. **Microchemical Journal**, v.110, p. 444-451, 2013.

LOPÉZ-BUCIO, J., NIETO-JACOBO, M.F., RAMÍREZ-RODRÍGUEZ, V., HERRERA-ESTRELLA, L. Organic acid metabolism in plants: from adaptive physiology to transgenic varieties for cultivation in extreme soils. **Plant Science**, v.160, p.1-13, 2000.

MACORIS, M.S., DE MARCHI, R., JANZANTTI, N.S., MONTEIRO, M. The influence of ripening stage and cultivation system on the total antioxidant activity and total phenolic compounds of yellow passion fruit pulp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.92, p.1886-1891, 2012.

MAILLARD, V., BOUGNOUX, P., FERRARI, P., JOURDAN, M.L., PINAULT, M., LAVILLONNIEREE, F.F., BODY, G.L., FLOCH, O., CHAJES, V.  $\omega$ -3 and  $\omega$ -6 fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a case-control study in Tours, France. **International Journal of Cancer**, v.98, p.78-83, 2002.

MARCONE, M.F., WANG, S., ALBABISH, W., NIE, S., SOMNARAIN, D., HILL, A. DIVERSE food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. **Food Research International**, v.51, p.729-747, 2013.

MAHAN, L.K., ESCOTT-STUM, S. **Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia**. 12ed. São Paulo: Elsevier; 2010.

MALACRIDA, C.R., KIMURA, M., JORGE, N. Phytochemicals and antioxidant activity of citrus seed oils. **Food Science and Technology Research**, v.18, p.399-404, 2012.

MARTINEZ-VALVERDE, I., PERIAGO, M.J., ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenolicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.50, n.1, p.5-18, 2000.

MEDINA, M. Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. **Journal of Functional Foods**, v.3, p.79-87, 2011.

MERCADANTE, A.Z., RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Effects of ripening, cultivar differences, and processing on the carotenoid composition of mango. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.128-130, 1998.

MIKULIC-PETKOVSEK, M., SLATNAR, A., STAMPAR, F., VEBERIC, R. HPLC–MS identification and quantification of flavonol glycosides in 28 wild and cultivated berry species. **Food Chemistry**, v.135, p.2138-2146, 2012.

MIRA, N.V.M., MASSARETTO, I.L., PASCUAL, C.S.C.I., MÁRQUEZ, U.M.L. Comparative study of phenolic compounds in different Brazilian rice (*Oryza sativa* L.) genotypes. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.22, p.405-409, 2009.

MOCAN, A., VLASE, L., VODNAR, D.C., BISCHIN, C., HANGANU, D., GHELDIU, A., OPREAN, R., SILAGHI-DUMITRESCU, R., CRIȘAN, G. Polyphenolic Content, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Lycium barbarum* L. and *Lycium chinense* Mill. Leaves. **Molecules**, v.19, p.10056-10073, 2014.

MOELLER, S.M., JACQUES, P.F., BLUMBERG, J.B. The potential role of dietary xanthophylls in cataract and age-related macular degeneration. **Journal of the American College of Nutrition**, v.19, p.522-527, 2000.

NAGATA, M., YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. **Journal Japanese Society of Food Science and Technology**, v.39, p.925-928, 1992.

NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v.1054, p.95-111, 2004.

NASCIMENTO, G.G.F., LOCATELLI, J., FREITAS, P.C., SILVA, G. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.247-256, 2000.

NELIS, J.H., DELEENHEER, P.A. Microbial sources of carotenoid pigments used in foods and feeds. **Journal of Applied Bacteriology**, v.70, p.181-191, 1991.

NISHINO, H., TOKUDA, H., SATOMI, Y., MASUDA, M., BU, P., ONOZUKA, M., YAMAGUCHI, S., OKUDA, Y., TAKAYASU, J. Cancer prevention by carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v.71, p.2273-2278, 1999.

NGUYỄN, H.V.H., SAVAGE, G.P. Oxalate content of New Zealand grown and imported fruits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.31, p.180-184, 2013.

NOGUEIRA, A.R.A., SOUZA, G.B. **Manual de Laboratórios: Solo, Água, Nutrição Vegetal, Nutrição Animal e Alimentos**. Embrapa, São Carlos, SP. 2005.

NOIPA, T., SRIJARANAI, S., TUNTULANI, T., NGEONTAE, W. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. **Food Research International**, v.44, p.798-806, 2011.

NUNES, J., LAGO, M., CASTELO-BRANCO, V., OLIVEIRA, F., TORRES, A., PERRONE, D., MONTEIRO, M. Effect of drying method on volatile compounds, phenolic profile and antioxidant capacity of guava powders. **Food Chemistry**, v.197, p.881-890, 2016.

OLIVES-BARBA, A.I., CÁMARA-HURTADO, M., SÁNCHEZ-MATA, M.C., FERNÁNDEZ-RUIZ, V., LÓPEZ-SÁENZ-DE-TEJADA, M. Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and beta-carotene in vegetables. **Food Chemistry**, v.95, p.328-336, 2006.

OLIVEIRA, J.E.D., SANTOS, A.C., WILSON, E.V. **Nutrição Básica**. 1 ed. São Paulo: Savier, 1982.

OSBORNE, D.R., VOOGT, P. **Análisis de los nutrientes de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1986.

PAN, M.H., CHIOU, Y.S., TSAI, M.L., HO, C.T. Anti-inflammatory activity of traditional Chinese medicinal herbs. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v.1, p.8-24, 2011.

PAREDES-LÓPEZ, O., CERVANTES-CEJA, M.L., VIGNA-PÉREZ, M., HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries: Improving human health and healthy aging, and promoting quality life - A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.65, p.299-308, 2010.

PDR (2007). Lyciumberries (Go-Qi-Zi) *Lycium barbarum*. **PDR for Herbal Medicines** (p.541-542). (Fourth ed). Montvale, NJ: Thompson Healthcare Inc.

PEDRO, A.C., GRANATO, D., ROSSO, N.D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. **Food Chemistry**, v.191, p.12-20, 2016.

PENG, Y., MA, C., LI, Y., LEUNG, K.S., JIANG, Z., ZHAO, Z. Quantification of zeaxanthin dipalmitate and total carotenoids in Lycium fruits (Fructus Lycii.). **Plant Foods for Human Nutrition**, v.60, p.161-164, 2005.

PEÑUELAS, J., SARDANS, J., OGAYA, R., ESTIARTE, M. Nutrient stoichiometric relations and biogeochemical niche in coexisting plant species: Effect of simulated climate change. **Polish Journal of Ecology**, v.56, p.613-622, 2008.

PEREIRA, C.S.C. **Caracterização nutricional e propriedades bioativas de espécies silvestres da etnoflora transmontana tradicionalmente consumida em verde**. 2011, 64f., Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança – Escola Superior Agrícola, Bragança.

PEREIRA, R.J., CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology**, v.3, p.146-152, 2012.

PERTUZATTI, P.B., SGANZERLA, M., JACQUES, A.C., BARCIA, M.T., ZAMBIAZI, R.C. Carotenoids, tocopherols and ascorbic acid content in yellow passion fruit (*Passiflora edulis*) grown under different cultivation systems. **LWT - Food Science and Technology**, v.64, p.259-263, 2015.

PETERSON, G.L. Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. **Analytical Biochemistry**, v.100, p.201-220, 1979.

PHILIP, S., CHRISTINA, A. **Organic Chemistry**. California: Prentice Hall, 2000.

PINTO, T.J.A., KANEKO, T.M., OHARA, M.T. **Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos**. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325p, 2003.

POTTERAT, O. Goji (*Lycium barbarum* and *L. chinense*): Phytochemistry, pharmacology and safety in the perspective of traditional uses and recent popularity. **Planta Medica**, v.76, p.7-19, 2010.

PRICE, K.R., PROSSER, T., RICHETIN, A.M.F., RHODES, M.J.C. A comparison of the flavonol content and composition in dessert, cooking and cider-making apples: distribution within the fruit and effect of juicing. **Food Chemistry**, v.66, p.489-494, 1999.

PRIOR, R.L., CAO, G. *In vivo* total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. **Free Radical Biology & Medicine**, v.27, p.1173-1181, 1999.

QIAN, J., LIU, D., HUANG, A. The efficiency of flavonoids in polar extracts of *Lycium chinense* Mill fruits as free radical scavenger. **Food Chemistry**, v.87, p.283-288, 2004.

RAMALHO, V.C., JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.

RAMFUL, D., BAHORUN, T., BOURDON, E., TARNUS, E., ARUOMA, O.I. Bioactive phenolics and antioxidant propensity of flavedo extracts of mauritian citrus fruits: Potential prophylactic ingredients for functional foods application. **Toxicology**, v.278, p.75-87, 2010.

RAZZAGHI-ASL, N., GARRIDO, J., KHAZRAEI, H., BORGES, F., FIRUZI, O. Antioxidant properties of hydroxycinnamic acids: a review of structure-activity relationships. **Current Medicinal Chemistry**, v.20, p.4436-4450, 2013.



RE, R., PELLEGRINI, N., PROTEGGENTE, A., PANNALA, A., YANG, M., ICEEVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

REZAIE, M., FARHOOSH, R., IRANSHAHI, M., SHARIF, A., GOLMOHAMADZADEH, S. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. **Food Chemistry**, v.173, p.577-583, 2015.

ROCK, C.L. Carotenoids: biology and treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v.75, p.185-197, 1997.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., KIMURA, M. General Procedure for Carotenoid Analysis. **Handbook for Carotenoid Analysis**, Washington, NW, USA, HavervestPlus, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., KIMURA, M., GODOY, H.T., AMAYA-FARFAN, J. Critical Review: Updated Brazilian database on food carotenoids: Factors affecting carotenoid composition. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.21, p.445-463, 2008.

ROSA, A., MAXIA, A., PUTZU, D., ATZERI, A., ERA, B., FAIS, A., SANNA, C., PIRAS, A. Chemical composition of *Lycium europaeum* fruit oil obtained by supercritical CO<sub>2</sub> extraction and evaluation of its antioxidant activity, cytotoxicity and cell absorption. **Food Chemistry**, v.230, p.82-90, 2017.

ROSTAMI, H., HAMED, H., YOLMEH, M. Some biological activities of pigments extracted from *Micrococcus roseus* (PTCC 1411) and *Rhodotorula glutinis* (PTCC 5257). **Internacional Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v.4, p.684-695, 2016.

SALEM, M.Z.M., ALI, H.M., MANSOUR, M.M. FATTY acid methyl esters from air-dried wood, bark, and leaves of *Cachychiton diversifolius* R. Br: antibacterial, antifungal, and antioxidant activities. **BioResources**, v.9, p.3835-3845, 2014.

SAGDIC, O., OZTURK, I., YILMAZ, M.T., YETIM, H. Effect of grape pomace extracts obtained from different grape varieties on microbial quality of beef patty. **Journal of Food Science**, v.76, p.515-521, 2011.

SALGADO, F. La realidad sobre el “Gou Qi Zi” o bayas Goji (Fructus *Lycii*). **Revista Internacional de Acupuntura**. Farmacopea, v.82, 2011.

SÁNCHEZ-MATA, M.C., PEÑUELA-TERUEL, M.J., CÁMARA-HURTADO, M., DÍEZ-MARQUÉS, C., TORIJA-ISASA, M.E. Determination of mono-, di- and oligosaccharides in legumes, by HPLC, using an amino bonded silica column. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3648-3652, 1998.

SÁNCHEZ-MATA, M.C., LOERA, R.D.C., MORALES, P., FERNÁNDEZRUIZ, V., CÁMARA, M., MARQUÉS, C. D., TARDÍO, J. Wild vegetables of the Mediterranean area as valuable sources of bioactive compounds. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v.59, p.431-443, 2012.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E.M., SENDRA, E., CARBONELL-BARRACHINA, A.A., MARTÍNEZ, J.J., HERNÁNDEZ, F. Fatty acids composition of Spanish black (*Morus nigra* L.) and white (*Morus alba* L.) mulberries. **Food Chemistry**, v.190, p.566-571, 2016.

SASIDHARAN, S., CHEN, Y., SARAVANAN, D., SUNDRAM, K.M., LATHA, Y.L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v.8, n.1, p.1-10, 2011.

SEYFRIED, M., SOLDERA-SILVA, A., BOVO, F., STEVAN-HANCKE, F.R., MAURER, J.B.B., ZAWADZKI-BAGGIO, S.F. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.18, n.1, p.201-214, 2016.

SIBERO, M.T., TRININGSIH, D.W., RADJASA, O.K., SABDONO, A., TRIANTO, A. Evaluation of antimicrobial activity and identification of yellow pigmented marine sponge associated fungi from teluk awur, jepara, central java. **Indonesian Journal of Biotechnology**, v.21, p.1-11, 2016.

SIDERER, Y., MAQUET, A., ANKLAM, E. Need for research to support consumer confidence in the growing organic food market. **Trends in Food Science & Technology**, v.16, p.332-343, 2005.

SILVA, M.L.C., COSTA, R.S.C., SANTANA, A.S., KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p.669-682, 2010.

SIMÕES, C.M.O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 1102p.

SINGLETON, V.L., ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdc-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., LAMUELA-RAVENTÓS, R.S. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.

SKINNER, M., HUNTER, D. **Bioactives in Fruit: Health Benefits and Functional Foods**. New Delhi: John Wiley & Sons, 2013.

SNODDERLY, D.M. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, p.1448-1461, 1995.

SOUZA, V., PEREIRA, P.A.P., LIMA, T.L.T., PIO, R., QUEIROZ, F. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian

blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. **Food Chemistry**, v.156, p.362-368, 2014.

SUÁREZ, M.H., RODRÍGUEZ, E.M.R., ROMERO, C.D. Mineral and trace element concentrations in cultivars of tomatoes. **Food Chemistry**, v.104, p.489-499, 2007.

TAIZ, L., ZEIGER, E. Metabolitos Secundários e defesa vegetal. In **Fisiologia vegetal**. Tradução: Eliane Romanato Santarém *et al.* – 3ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TIAN, X., WANG, J., CUI, S., WEI, Z. Taste characterization for the quality assessment of dried *Lycium* fruits. **Journal of Food Quality**, v.38, p.103-110, 2015.

TRUMBO, P., SCHLICKER, S., YATES, A.A., POOS, M. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. **Journal of the American Dietetic Association**, v.102, p.1621-1630, 2002.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (2016). National Nutrient Database for Standard Reference. **Basic Report 09110, Goji berries, dried**. Report Date: June 08, 2017 15:22 EDT.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (2017). Branded Food Products Database. **Full Report (All Nutrients) 45211368, Organic Goji berries, UPC: 077890357767**. Food Group: Branded Food Products Database. Report Date: June 08, 2017 15:27 EDT.

ULTEE, A., BENNIK, M.H.J., MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, p.1561-1568, 2002.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1-40, 2006.

VASCO, C., RUALES, J., KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chemistry**, v.111, p.816-823, 2008.

VAZQUEZ-ODÉRIZ, M., VÁZQUEZ BLANCO, M.E., LÓPEZ HERNÁNDEZ, J., SIMAL LOZANO, J., ROMERO-RODRÍGUEZ, M.A. Simultaneous determination of organic acids and vitamin C in green beans by liquid chromatography. **Journal of AOAC International**, v.77, p.1056-1059, 1994.

VOSS, D.H. Relating colourimeter measurement of plant colour to the royal horticultural society colour chart. **HortScience**, v.27, p.1256-1260, 1992.

XIN, T.; YAO, H.; GAO, H.; ZHOU, X.; MA, X.; XU, C.; CHEN, J.; HAN, J.; PANG, X.; XU, R.; SONG, J.; CHEN, S. Super food *Lycium barbarum* (Solanaceae)

traceability via an internal transcribed spacer 2 barcode. **Food Research International**, v.54, p.1699-1704, 2013.

XI, Y., SULLIVAN, G., JACKSON, A., ZHOU, G., SEBRANEK, J. Use of natural antimicrobials to improve the control of *Listeria monocytogenes* in a cured cooked meat model system. **Meat Science**, v.88, p.503-511, 2011.

XUE, J., DAVIDSON, P.M., ZHONG, Q. Thymol nanoemulsified by whey protein-maltodextrin conjugates: the enhanced emulsifying capacity and antilisterial properties in milk by propylene glycol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.61, p.12720-12726, 2013.

WALLER, R.F., KEELING, P.J., DONALD, R.G.K., STRIEPEN, B., HANDMAN, E., LANG-UNNASCH, N., COWMAN, A.F., BERSA, G.S., ROOS, G.S., MCFADDEN, G.I. Nuclear-encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.21, p.12352-12357, 1998.

WANG, S.Y., CHEN, C., SCIARAPPA, W., WANG, C.Y., CAMP, M.J. Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, p.5788-5794, 2008.

WANG, J.; HU, Y.; WANG, D.; LIU, J.; ZHANG, J.; ABULA, S., ZHAO, B.; RUAN, S. Sulfated modification can enhance the immune-enhancing activity of *Lycium barbarum* polysaccharides. **Cellular Immunology**, v.263, n.2, p.219-223, 2010.

WATANABE, M., OHTA, Y., LICANG, S., MOTOYAMA, N., KIKUCHI, J. Profiling contents of water-soluble metabolites and mineral nutrients to evaluate the effects of pesticides and organic and chemical fertilizers on tomato fruit quality. **Food Chemistry**, v.169, p.387-395, 2015.

WENG-PING, M., ZHI-JING, N., HE, L., MIN, C. Changes of the main carotenoid pigment contents during the drying processes of the different harvest stage fruits of *Lycium barbarum* L. **Agricultural Sciences in China**, n.7, v.3, p.363-369, 2008.

WIEGAND, I., HILPERT, K., HANCOCK, R.E.W. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. **Nature protocols**, v.3, p.163-75, 2008.

WONG, H.K., YONG, S.T., CHAN, F.J., MARDHATI, M. Analysis of lutein and zeaxanthin in goji berry (*Lycium* species) and corn by high performance liquid chromatography. **Journal of Science and Technology in the Tropics**, v.9, p.133-141, 2013.

WU, B.H., ZHAO, J.B., CHEN, J., XI, H.F., JIANG, Q., LI, S.H. Maternal inheritance of sugars and acids in peach (*P. persica* (L.) Batsch) fruit. **Euphytica**, v.188, p.333-345, 2012.

YANG, K., LI, H., DONG, J., DONG, Y., WANG, C. Expression profile of polyunsaturated fatty acids in colorectal cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v.21, n.8, p.2405-2412, 2015.

YANG, Y., SONG, X., SUI, X., QI, B., WANG, Z., LI, Y., JIANG, L. Rosemary extract can be used as a synthetic antioxidant to improve vegetable oil oxidative stability. **Industrial Crops and Products**, v.80, p.141-147, 2016.

YAO, X., PENG, Y., XU, L., LIA, L., WU, L., XIAO, P. Phytochemical and biological studies of *Lycium* medicinal plants. **Chemistry & Biodiversity**, v.8, p. 998-1000, 2011.

YE, C.L., JIANG, C.J. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from *Plantago asiatica* L. by response surface methodology. **Carbohydrate Polymers**, v.84, p.495-502, 2011.

YIN, G., DANG, Y. Optimization of extraction technology of the *Lycium barbarum* polysaccharides by Box–Behnken statistical design. **Carbohydrate Polymers**, v.74, p.603-610, 2008.

ZANOLI, R., GAMBELLI, D., VAIRO, D. Scenarios of the organic food market in Europe. **Food Policy**, v.37, p.41-57, 2012.

ZHANG, D., HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**, v.88, p.503-509, 2004.

ZHANG, Z., LIU, X., WU, T., LIU, J., ZHANG, X., YANG, W., GOODHEART, M.J., ENGELHARDT, J.F., WANG, Y. Selective suppression of cervical cancer Hela cells by 2-O- $\beta$ -D-glucopyranosyl-L-ascorbic acid isolated from the fruit of *Lycium barbarum* L. **Cell Biological Toxicology**, v.27, p.107-121, 2011.

ZHANG, J., LI, M., ZHENG, G. Effect of stand age on soil microbial community structure in wolfberry (*Lycium barbarum* L.) fields. **Acta Ecologica Sinica**, v.37, p.10-17, 2017.

ZHAO, L., QIU, Z., NARASIMHAMOORTHY, B., GREAVES, J.A. Development of a rapid, high-throughput method for quantification of zeaxanthin in Chinese wolfberry using HPLC–DAD. **Industrial Crops and Products**, v.47, p.51-57, 2013.

ZHAO, Q., DONG, B., CHEN, J., ZHAO, B., WANG, X., WANG, L., ZHA.S., WANG, Y., ZHANG, J., WANG, Y. Effect of drying methods on physicochemical properties and antioxidant activities of wolfberry (*Lycium barbarum*) polysaccharide. **Carbohydrate Polymers**, v.127, p.176-181, 2015.